

Aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus del papiloma humano tipo 16

María Elena Escobar Ospina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería de Sistemas e Industrial
Bogotá, D.C.
Año 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ

Aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus del papiloma humano tipo 16

María Elena Escobar Ospina
Código: 02300675

Tesis como requisito para optar por el grado de
Doctor en Ingeniería – Sistemas y Computación

Director:
Dr. Jonatan Gómez Perdomo, Ph.D.
Doctor en Ciencias de la Computación

Co-Director:
Dr. Emiliano Barreto Hernández, Ph.D.
Doctor en Statistics and Operational Research Bioinforma

Línea de Investigación:
Vida Artificial

Grupo de Investigación
ALIFE

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería
Departamento de Ingeniería de Sistemas e Industrial
Bogotá, D.C.
Año 2016



AGRADECIMIENTOS

Durante estos años de investigación, he contado con personas maravillosas que me han brindado su confianza, apoyo, orientación profesional y estímulo constante, a quienes agradezco y considero son parte integral de este proceso de construcción.

Mi sentimiento de gratitud, para el doctor Jonatan Gómez Perdomo, a quien nunca podré agradecer como merece por todos estos años, por haberme permitido hacer parte de su grupo de investigación de vida artificial, por su orientación y guía profesional permanente, por su calidad como ser humano, por enseñarme que no hay límites que impidan realizar nuestros sueños, por brindarme siempre su apoyo incondicional, y por dirigir mi trabajo de tesis doctoral.

Mi agradecimiento sincero, para el doctor Emiliano Barreto Hernández, por su invaluable ayuda, por su orientación y guía en un campo de investigación que admiro, respeto y valoro. Un “gracias” tal vez no resulta ser suficiente para manifestar el sentimiento de gratitud por todo lo recibido, tanto en el campo profesional como el aspecto humano, por aceptar co-dirigir mi trabajo de investigación y por enseñarme a admirar la biotecnología.

Mi respeto, admiración y agradecimiento sincero, para la doctora María Teresa Reguero Reza, por su valioso apoyo incondicional y desinteresado en la construcción de este trabajo, por su valiosa guía profesional en el campo de la biotecnología, y por su trato profesional, amable y cariñoso que siempre agradeceré y recordaré.

Gracias a todos mis profesores, por sus horas de instrucción y orientación, y especialmente por haberme permitido explorar el mundo de la vida artificial y la biotecnología.

Gracias a mis compañeros, de quienes siempre recibí grandes aportes, acompañamiento, solidaridad y respeto.

Gracias a mi familia, por su amor y apoyo incondicional, por su enorme paciencia para entender mis ausencias, y por ser siempre mi fuente de inspiración.

María Elena Escobar Ospina



TABLA DE CONTENIDO

Resumen
Agradecimientos
Lista de Figuras
Lista de Tablas

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

- 1 Introducción**
- 1.1 Antecedentes y Justificación
 - 1.1.1. Marco Teórico
 - 1.1.1.1. Cáncer de cuello uterino
 - 1.1.1.2. Virus de papiloma humano
 - 1.1.1.3. Vacunas
 - 1.1.1.4. Sistema Inmune
 - 1.1.1.5. Sistemas complejos
 - 1.1.1.6. Autómatas células y modelos basados en agentes
 - 1.1.1.7. Algoritmos evolutivos
 - 1.1.2. Antecedentes
 - 1.1.2.1. Vacunas para prevenir el virus de papiloma humano
 - 1.1.2.2. Vacunas para tratar cáncer
 - 1.1.2.3. Prototipo modelo de crecimiento del HPV16
 - 1.1.3. Justificación
- 1.2 Definición del problema
- 1.3 Objetivos
 - 1.3.1. Objetivo general
 - 1.3.2. Objetivos específicos
- 1.4 Organización del trabajo de investigación
- 1.5 Abreviaturas

CAPÍTULO II - PRELIMINARES

- 2 Preliminares**
- 2.1 Sistemas complejos**
- 2.2 Sistemas biológicos**
- 2.3 Vida artificial**
 - 2.3.1. Autómatas celulares
 - 2.3.1. Modelos basados en agentes
- 2.4 Sistema Inmune**
 - 2.4.1. Sistema inmune biológico
 - 2.4.1.1. Diferenciación, proliferación y apoptosis celular
 - 2.4.1.2. Receptores TLRs (Toll-like receptors)
 - 2.4.1.3. Producción de citoquinas
 - 2.4.2. Sistema inmune artificial
- 2.5 Virus de papiloma humano tipo 16 (HPV16)**



- 2.6 Respuesta del sistema inmune ante HPV16**
- 2.7 Vacunas**
- 2.8 Resumen del presente capítulo**

CAPÍTULO III – DISEÑO DE UNA APLICACIÓN DE VIDA ARTIFICIAL

3 Diseño de una aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus de papiloma humano tipo 16 como agente etiológico de cáncer de cuello uterino

3.1. Diseño General del Modelo

- 3.1.1. Herramientas de vida artificial aplicadas al desarrollo del modelo propuesto
- 3.1.2. Modelo conceptual en tres niveles
 - 3.1.2.1. Primer nivel. Diferenciación, proliferación y apoptosis celular
 - 3.1.2.2. Segundo nivel. Activación y señalización receptores Toll-like
 - 3.1.2.3. Tercer nivel. Secreción e interacción de citoquinas
- 3.1.3. Consideraciones preliminares
 - 3.1.3.1. Respuesta inmune ante infección por HPV
 - 3.1.3.2. Descripción procedimiento de diferenciación celular ante la detección de una infección simple
 - 3.1.3.3. Descripción procedimiento general ante la detección de una infección viral
 - 3.1.3.4. Descripción procedimiento específico ante la detección de infección por HPV16
 - 3.1.3.5. Cáncer e inmunidad
- 3.1.4. Activación puntos de control
 - 3.1.4.1. Producción de citoquinas que promueven activación de células-T
 - 3.1.4.2. Activación de células-T dependientes de TLRs
 - 3.1.4.3. Dinámica entre grupos celulares que activa respuestas inmunes innatas y adaptativas
 - 3.1.4.4. Dinámica de la reacción en centro germinal (GC)
- 3.1.5. Estados y transiciones
 - 3.1.5.1. Puntos de chequeo
 - 3.1.5.2. Reglas
 - 3.1.5.3. Estados
 - 3.1.5.4. Transiciones
 - 3.1.5.5. Interacciones
- 3.1.6. Descripción del modelo
 - 3.1.6.1. Lógica en la predicción de maduración de afinidad
 - 3.1.6.2. Interacciones específicas
 - 3.1.6.3. Paso a paso en la construcción del modelo
 - 3.1.6.3.1. Paso a paso primer nivel. Microambiente celular
 - 3.1.6.3.2. Paso a paso segundo nivel. Microambiente TLRs
 - 3.1.6.3.3. Paso a paso tercer nivel. Microambiente citoquinas
 - 3.1.6.3.4. Control de vacunas. Microambiente extracelular.



CAPÍTULO IV – IMPLEMENTACIÓN PROTOTIPO APLICACIÓN VIDA ARTIFICIAL

4.1. Implementación del Prototipo de una aplicación de vida artificial

- 4.1.1. Características de la herramienta de desarrollo
- 4.1.2. Descripción del prototipo
 - 4.1.2.1. Lógica implementada en el prototipo
 - 4.1.2.1.1. Perspectiva externa
 - 4.1.2.1.2. Propiedades dinámica global
 - 4.1.2.1.3. Perspectiva interna TLRs
 - 4.1.2.1.4. Propiedades dinámica local en TLRs
 - 4.1.2.1.5. Perspectiva interna Citoquinas
 - 4.1.2.1.6. Propiedades dinámica local en citoquinas
 - 4.1.2.1.7. Propiedades de estado microambiente externo
 - 4.1.2.1.8. Propiedades de estado sensores de agentes
 - 4.1.2.2. Monitores de datos
 - 4.1.2.3. Gráficas de tendencia
- 4.1.3. Discusión sobre los parámetros del modelo de vida artificial
 - 4.1.3.1. Parámetros globales
 - 4.1.3.2. Parámetros de control

CAPÍTULO 5 – EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS

5.1. Experimentación y resultados

- 5.1.1. Experimentación
- 5.1.2. Resultados
 - 5.1.2.1. Experimentos tipo-1
 - 5.1.2.2. Experimentos tipo-2
 - 5.1.2.3. Experimentos tipo-3
 - 5.1.2.4. Experimentos tipo-4
 - 5.1.2.5. Experimentos tipo-5
 - 5.1.2.6. Experimentos tipo-6
 - 5.1.2.7. Experimentos tipo-7
- 5.1.3. Análisis de tendencia experimentos realizados en HPV16-ALIFE
 - 5.1.3.1. Tendencia IL-12
 - 5.1.3.2. Tendencia población CTLs
 - 5.1.3.3. Tendencia expresión proteínas E6 y E7
- 5.1.4. Análisis de eficacia vacunas terapéuticas en HPV16-ALIFE

5.2. Resumen del capítulo

CAPÍTULO 6 - CONCLUSIONES

6 Conclusiones y trabajos futuros

- 6.1. Conclusiones
- 6.2. Trabajos futuros

Glosario de Términos

Referencias



ANEXOS

- Anexo 1. Libro visión holística del sistema inmune humano (Tomo I)
- Anexo 2. Libro visión holística del sistema inmune humano frente al virus de papiloma humano tipo 16 (Tomo II)



RESUMEN

Este trabajo de investigación presenta un modelo de vida artificial inspirado en el ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16 (como agente etiológico de cáncer cervical), en su interacción con el sistema inmune humano y frente al desafío que representa una vacuna terapéutica. Concebido como un sistema complejo y caracterizado mediante técnicas de vida artificial, se diseña un modelo conceptual y se construye un prototipo funcional que permite simular esta interacción, considerando el conocimiento biológico que actualmente se tiene de estos procesos. La caracterización biológica y mecanismos que surgen a partir de la interacción entre patógeno y huésped, y el desarrollo de un proceso infeccioso cuya persistencia puede conducir al desarrollo de cáncer cervical, permite definir un modelo conceptual en términos de reglas, puntos de chequeo, estados, transiciones e interacciones. Aunado a la caracterización del ciclo de vida HPV16, cuyo modelo y prototipo fue presentado previamente en (Escobar-Ospina, M.E. y Gómez-Perdomo, J., 2013), el diseño del modelo conceptual y la construcción del prototipo funcional de la aplicación de vida artificial que actualmente se presenta, consideran la caracterización biológica de varias poblaciones celulares involucradas, incluidos sus procesos de diferenciación, proliferación y muerte celular programada. Así mismo, se incluye la caracterización de vías de señalización de un grupo de receptores claves en la respuesta inmune (TLRs), y también cinco (5) grupos de familias de citoquinas que incluyen cuarenta y ocho (48) diferentes miembros, perfilando sus componentes y modelando patrones de expresión que se observan en respuestas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. A partir de estos componentes y sus interacciones, surge la dinámica que permite simular la respuesta del sistema inmune humano ante la detección y evolución del proceso infeccioso causado por HPV16. A este conjunto, se suman las herramientas que permiten simular la aplicación de algunos tipos de vacunas terapéuticas que modifican el comportamiento del sistema inmune. El reconocimiento de las poblaciones celulares, receptores y citoquinas, frente al proceso infeccioso desencadenado por HPV16, aunado al conocimiento biológico que actualmente se tiene, hace posible simular estos microambientes en aras de observar procesos de regresión o progresión de la enfermedad, luego de la aplicación de una vacuna terapéutica cuyo objetivo se encuentre dirigido hacia alguno de los componentes que intervienen en el modelo que se presenta (proteínas virales, cascadas de señalización, expresión de citoquinas). La construcción de este modelo busca apoyar procesos de simulación en actividades de investigación para el desarrollo de vacunas que procuren controlar enfermedades causadas por infección HPV16.



LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1: Modelo conceptual HPV16 ALIFE. Representación esquemática de las tres capas que simbolizan el sistema inmune, siendo parte del microambiente del huésped en el modelo de vida artificial propuesto.
- Figura 3.2: Diseño general del modelo HPV16 ALIFE. Representación esquemática de las tres capas que simbolizan el sistema inmune frente al microambiente del huésped y su interacción con el ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16, del modelo de vida artificial propuesto.
- Figura 3.3: Representación esquemática del proceso de diferenciación celular de acuerdo con linajes mieloides y linfoides, identificando reguladores maestros, marcadores y citoquinas principales vinculados a cada grupo celular.
- Figura 3.4: Diferenciación células-T CD4+. Representación esquemática de citoquinas que permiten definir perfiles específicos por cada grupo de células Th1, Th2, Tfh, Th17, y Treg, caracterizados en el modelo de vida artificial propuesto.
- Figura 3.5: Mapa conceptual interacción celular general. Versión comprimida de los tipos de células que corresponden a poblaciones que participan en el modelo de vida artificial, considerando la expresión de citoquinas, moléculas y TLRs relacionados.
- Figura 3.6: Mapa conceptual interacciones celulares detalladas. Versión detallada de la diferenciación celular y la expresión de citoquinas, moléculas y TLRs vinculadas a cada una de las poblaciones celulares del modelo de vida artificial que se plantea.
- Figura 3.7: Receptores Toll-like. Vías de señalización TLRs.
- Figura 3.8: Mapa conceptual vías señalización TLR3, TLR4, TLR7/TLR8, TLR9.
- Figura 3.9: Familia de citoquinas incorporadas al modelo HPV16-ALIFE.
- Figura 3.10: Control inmune ante infección por HPV16.
- Figura 3.11: Producción de citoquinas que promueven activación de células-T.
- Figura 3.12: Activación de células-T por TLRs.
- Figura 3.13: Interacción entre células-T y células-B.
- Figura 3.14: Dinámica de la reacción en centro germinal.
- Figura 3.15: Diseño general del modelo de vida artificial propuesto desde la perspectiva de automática celular.
- Figura 3.16: Representación esquemática del microambiente de respuesta inmune en modelo de vida artificial propuesto.
- Figura 4.1: Interface gráfica prototipo aplicación vida artificial al estudio de vacunas para el control del HPV16.
- Figura 4.2: Convenciones visuales en representación de poblaciones celulares incluidas en el prototipo HPV16-ALIFE.
- Figura 4.3: Vista principal interacción celular prototipo HPV16-ALIFE.



- Figura 4.4: Monitores de datos en interface gráfica prototipo HPV16-ALIFE.
- Figura 4.5: Gráficas de tendencia en interface gráfica prototipo HPV16-ALIFE.
- Figura 4.6: Parámetros globales prototipo HPV16-ALIFE.
- Figura 4.7: Confirmación aplicación dosis de vacuna pre-programada.
- Figura 5.1: Diagrama diseño experimental en prototipo del modelo HPV16-ALIFE.
- Figura 5.2: Segmentos del registro de datos e imagen reportados por modelo HPV16-ALIFE.
- Figura 5.3: Gráficas comportamiento HPV16-ALIFE.
- Figura 5.4.1: Tendencia niveles de las lesiones observadas y niveles de expresión de proteínas virales en el modelo HPV16-ALIFE – Experimento tipo-1.
- Figura 5.4.2: Tendencia niveles de las lesiones observadas y niveles de expresión de proteínas virales en el modelo HPV16-ALIFE – Experimento tipo-2.
- Figura 5.4.3: Tendencia niveles de las lesiones observadas y niveles de expresión de proteínas virales en el modelo HPV16-ALIFE – Experimento tipo-3.
- Figura 5.4.4: Tendencia niveles de las lesiones observadas y niveles de expresión de proteínas virales en el modelo HPV16-ALIFE – Experimento tipo-4.
- Figura 5.4.5: Tendencia niveles de las lesiones observadas y niveles de expresión de proteínas virales en el modelo HPV16-ALIFE – Experimento tipo-5.
- Figura 5.4.6: Tendencia niveles de las lesiones observadas y niveles de expresión de proteínas virales en el modelo HPV16-ALIFE – Experimento tipo-6.
- Figura 5.4.7: Tendencia niveles de las lesiones observadas y niveles de expresión de proteínas virales en el modelo HPV16-ALIFE – Experimento tipo-7.
- Figura 5.5: Tendencia niveles de secreción de IL-12 observados en experimentos realizados en prototipo HPV16-ALIFE.
- Figura 5.6: Tendencia proliferación población CTL observada en experimentos realizados con vacunación.
- Figura 5.7: Tendencia proliferación población CTL observada en experimentos realizados con vacunas con adyuvante.
- Figura 5.8: Tendencia expresión proteína E6 en experimentos realizados en prototipo HPV16-ALIFE.
- Figura 5.9: Tendencia expresión proteína E7 en experimentos realizados en prototipo HPV16-ALIFE.
- Figura 5.10: Análisis de eficacia de vacunas sin adyuvante utilizadas en prototipo HPV16-ALIFE.



- Figura 5.11: Análisis de eficacia de vacunas con adyuvante utilizadas en prototipo HPV16-ALIFE.
- Figura 5.12: Tendencia condiciones de pre-cáncer y cáncer frente a experimentos realizados en prototipo HPV16-ALIFE.
- Figura 5.13: Tendencia lesiones CIN frente a experimentos realizados en prototipo HPV16-ALIFE.



LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1:	Porcentaje de participación por tipo de célula en flujo sanguíneo.
Tabla 5.1.1:	Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE. Experimentos tipo-1, realizados sin vacuna.
Tabla 5.1.2:	Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE. Experimentos tipo-2, realizados con vacuna DC=10, Dosis=3, Intervalo= 2 semanas.
Tabla 5.1.3:	Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE. Experimentos tipo-3 realizados con vacuna DC=100, Dosis=3, Intervalo= 2 semanas.
Tabla 5.1.4:	Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE. Experimentos tipo-4, realizados con vacuna DC=1000, Dosis=3, Intervalo= 2 semanas.
Tabla 5.1.5:	Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE. Experimentos tipo-5, realizados con vacuna DC=10, Dosis=3, Intervalo= 2 semanas, e IL-2 en estado activo.
Tabla 5.1.6:	Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE. Experimentos tipo-6, realizados con vacuna DC=10, Dosis=3, Intervalo= 2 semanas, y TLR3 en estado activo.
Tabla 5.1.7:	Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE. Experimentos tipo-7, realizados con vacuna DC=10, Dosis=3, Intervalo= 2 semanas, y TLR9 en estado activo.

I INTRODUCCIÓN

En el campo de la vida artificial y la biología ha existido una relación que ha permitido obtener contribuciones en ambos campos. Si bien la biología teórica ha precedido algunos desarrollos en vida artificial, también es cierto que la vida artificial ha contribuido a la teoría de la biología, con el desarrollo de modelos y herramientas computacionales que han ayudado al estudio de varias de sus hipótesis. Herramientas computacionales y estadísticas han sido utilizadas para inferir la organización global y local de varios sistemas biológicos, que luego bajo el diseño de modelos matemáticos, han ayudado a explicar y predecir la dinámica de su comportamiento. Desde la perspectiva biológica, y específicamente sobre el sistema inmune, se han realizado descripciones exhaustivas de componentes celulares y moleculares, que han ayudado a explicar en parte los mecanismos que median sus interacciones, con base en colección de datos obtenidos a través de tecnologías de alto rendimiento, que han dado lugar a modelos con un enfoque basado en datos y que han logrado ser exitosos, por ejemplo, en el hallazgo de biomarcadores claves en algunos procesos que han resultado ser útiles en prevención, diagnóstico y tratamiento clínico. Desde la perspectiva matemática, se han construido ecuaciones con base en el conocimiento previo de procesos biológicos, en procura de inferir hipótesis que conduzcan a predicciones específicas, que luego son confrontadas con datos empíricos que dan lugar a la selección de la hipótesis más cercana a las mediciones reales (Arazi et al., 2013). Si bien ambos enfoques, han sido valiosos en los aportes al conocimiento que actualmente se tiene de varios sistemas biológicos, el sistema inmune en particular, continúa siendo un sistema altamente complejo que aún no cuenta con todas las explicaciones frente a los mecanismos que emergen, al activar sus respuestas en defensa del huésped ante la amenaza que implican ciertos patógenos.

Todos los sistemas biológicos tienen un estado interno y su comportamiento reactivo es por lo tanto una función de la historia que le antecede en todos los elementos que interactúan en su entorno, y también la expresión de comportamientos generados intrínsecamente, tiene lugar dentro del contexto de eventos y condiciones externas. No obstante, es útil considerar que un comportamiento biológico puede ser más o menos conducido por factores internos y externos (Froese et al., 2015). En ciencias de la computación, principios de la complejidad destacan la emergencia de ciertas propiedades y la creación de nuevos órdenes que no son explicables desde el punto de vista de los elementos que suman como partes de un todo, sino del todo que resulta ser superior a la suma de las partes. De esta forma fue expresado por Kauffman en 1993 (Kauffman, 1993). Los sistemas complejos están compuestos de agentes heterogéneos que exhiben varios comportamientos que pueden ser definidos con reglas simples, que les permite adaptarse y evolucionar a través de interacciones de agentes para formar un sistema. Varios de sus principios, tales como impredecibilidad, no-linealidad, variación y diversidad, interacciones, fronteras, adaptación, conectividad e interdependencia, retroalimentación, reconocimiento de patrones, auto-organización, selección, co-evolución, reglas simples (Alaa et al., 2013), entre otros, conforman una poderosa herramienta que permite el modelamiento de sistemas tan complejos como lo es el sistema inmune.

En particular, el uso de herramientas de vida artificial, tales como sistemas complejos, modelos basados en agentes y autómatas celulares, conforman la base conceptual que ha permitido la construcción de un prototipo de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus del papiloma humano tipo 16, como agente etiológico de cáncer de cuello uterino. Con base en el conocimiento biológico que actualmente se tiene, y el uso de las herramientas de vida artificial, el modelo propuesto procura simular la interacción entre el ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16 y las respuestas del sistema inmune innato y adaptativo del huésped, así como también las interacciones que desde el microambiente externo puede generar la influencia de vacunas terapéuticas orientadas al control de enfermedades causadas por este virus.

1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control de virus de papiloma humano tipo 16, como agente etiológico de cáncer de cuello uterino, se inspira inicialmente en las dificultades que para el mundo representan las cifras de mujeres afectadas por cáncer de cuello uterino, también por las dificultades que surgen a partir de uno de sus agentes causales, el virus de papiloma humano tipo 16, y el interés en aportar desde la perspectiva computacional, herramientas que coadyuven en la investigación de vacunas terapéuticas que permitan mitigar sus letales efectos.

1.1.1. Marco Teórico

A continuación se muestra la relevancia que tiene el cáncer de cuello uterino como un problema de salud pública, se explica la incidencia del virus de papiloma humano como agente causal, la importancia que tienen las vacunas y su relación con el sistema inmune. Además, se presentan los conceptos que desde el componente computacional, conforman las herramientas que permiten el diseño del modelo conceptual y construcción del prototipo de vida artificial propuestos.

1.1.1.1. Cáncer de cuello uterino

De acuerdo con las cifras que presenta la Organización Mundial de la Salud en su informe de Estadísticas Sanitarias Mundiales 2012, y confirman la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), *Globocan*, *American Cancer Society*, entre otras autoridades encargadas de reportar cifras oficiales de cáncer, se estima que las defunciones debidas al cáncer en general ascenderán de 7,6 a 13 millones de personas en el año 2030, y que las debidas a enfermedades infecciosas disminuirán a lo largo de los próximos veinte (20) años. Sin embargo, infecciones tales como la Hepatitis B y Hepatitis C (asociadas a cáncer de hígado), infección por Virus de Papiloma Humano (asociada al cáncer de cuello uterino) y la infección por *Helicobacter pylori* (asociada a cáncer de estómago), son responsables del veinte por ciento (20%) de las defunciones por cáncer en los países de ingresos bajos y medios, y del nueve por ciento (9%) en los de ingresos altos. Los tipos de cáncer varían según los factores de riesgo a los que se ve expuesta la población. En particular, el cáncer de cuello uterino en África Subsahariana, es la principal causa de muerte por cáncer en la población femenina de todas las edades, debido a la alta prevalencia de la infección por virus de papiloma humano, lo

mismo ocurre en Centro América, Sur de Asia y Melanesia. En mujeres entre los quince (15) y cuarenta y cuatro (44) años, es primera causa de muerte en estos mismos sitios geográficos, además de la zona del Caribe y Sur América, incluido Colombia (ACS, 2012a; Globocan, 2008; OMS, 2012; NCI, 2012; WHO/ICO, 2010).

En el año 2012, la IARC reporta el cáncer de cuello uterino como el cuarto diagnóstico de cáncer más común en mujeres de todas las edades y la quinta causa de muerte por cáncer en el mundo. Con datos correspondientes al cierre de 2012, se reportan 527,624 nuevos casos y 265,672 muertes. África, América Latina y Asia, representan el ochenta y cinco por ciento (85%) de las muertes por esta causa. Analizadas las cifras es evidente concluir que el cáncer de cuello uterino es uno de los tipos de cáncer más letales en países pobres (ACS, 2012a; OMS, 2012; WHO/ICO, 2010).

El cáncer cervical es un problema de salud pública, considerado como el cuarto tipo de cáncer más frecuente entre mujeres de todo el mundo, y la segunda causa más común de cáncer en mujeres entre los quince (15) y cuarenta y cuatro (44) años de edad en el mundo (Bruni et al., 2015). En Colombia continúa siendo el segundo diagnóstico de cáncer más común con 4,661 nuevos casos al año y la segunda causa de muerte con 1,986 muertes al año (ACS, 2012a; Globocan, 2008; OMS, 2012).

1.1.1.2. Virus de papiloma humano

El virus de papiloma humano (**HPV**), hace parte de una familia de virus que pueden causar un crecimiento anormal en los tejidos y otros cambios a nivel celular. El virus de papiloma humano tipo 16 (**HPV16**), es el principal virus detectado en lesiones invasivas de cáncer de cuello uterino, y el que reporta mayor persistencia y prevalencia en lesiones pre-malignas y malignas. La probabilidad de adquirir la infección por HPV16 es extremadamente alta en individuos sexualmente activos, no obstante puede desaparecer después de ser un caso histológicamente confirmado (Clifford et al., 2005; Dunne et al., 2007; Gemignani et al., 2004; Yamada et al., 1995). La infección por HPV se encuentra localizada en el epitelio de la mucosa y las replications del genoma viral ocurren en las capas epiteliales bajas. Como las células epiteliales liberan espontáneamente nuevas partículas del virus al final de su ciclo de vida, esto evita la inducción del virus durante el rompimiento de la membrana celular, evitando de esta forma la iniciación de respuestas inflamatorias, con lo cual el virus logra en gran parte permanecer oculto del sistema inmune. Las respuestas inmunes naturales que siguen a la infección no siempre protegen de forma fiable contra una siguiente infección por este virus, por lo tanto, el riesgo de reinfección es de por vida, lo cual representa un desafío para la efectividad de una vacuna (Garçon et al., 2011).

El HPV como patógeno prevalente, genera lesiones en el cuello del útero, vagina, cavidades orales y anogenitales, sin embargo la epidemiología molecular de la infección ha sido principalmente caracterizada en las lesiones del cuello del útero. Es ampliamente aceptado que la persistencia de la infección por virus de papiloma humano es una condición necesaria para el desarrollo de lesiones precancerosas cervicales. Cerca del cien por ciento (100%) de las mujeres que reportan cáncer de cuello uterino, presentan infección cervical por el virus del papiloma humano. Estudios realizados han identificado quince (15) tipos de HPV que están asociados con el riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino (ACS, 2012).

HPV16 y HPV18, son los tipos que reportan un mayor número de casos. La probabilidad de adquirir la infección cervical con al menos un tipo de HPV es extremadamente alta en individuos sexualmente activos, sin embargo puede desaparecer espontáneamente en los siguientes dos (2) o cuatro (4) años.

Quienes presentan la infección por HPV no necesariamente desarrollan cáncer, porque el sistema inmunológico puede eliminarlo en un periodo relativamente corto. En algunos casos, un pequeño porcentaje de infecciones persistentes puede conducir al desarrollo de neoplasia e influir en la regresión o progresión del virus y conducir a cáncer invasivo de cuello uterino después de un periodo de latencia (Clifford et al., 2005; Yamada et al., 1995). No se tiene claridad en los factores que inciden en la progresión o regresión del HPV, pero si se tiene evidencia de los factores que influyen en la persistencia viral y que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades del cuello uterino (Dunne et al., 2007; Gemignani et al., 2004).

1.1.1.3. Vacunas

Las vacunas son medicamentos que estimulan la naturaleza del sistema inmune para proteger el cuerpo de invasores extraños, principalmente agentes infecciosos que puedan causar enfermedad. El sistema inmune es una red de órganos, tejidos y células especializadas que actúan de forma colectiva para defender el cuerpo. Cuando un microbio infeccioso ataca el cuerpo, el sistema inmune lo reconoce como extraño, lo destruye y lo recuerda para prevenir otra infección causada por el mismo virus en el futuro. Las vacunas tradicionales usualmente contienen versiones inofensivas de microorganismos, muertos o atenuados, o partes de los mismos, que no causan enfermedad pero que son capaces de estimular una respuesta inmune contra éstos. Cuando el sistema inmune encuentra estos epítopes (antígenos) presentes en las vacunas, responde eliminándolas del cuerpo y desarrollando una memoria de ellos. La memoria inducida por vacunas prepara al sistema inmune para actuar rápidamente y proteger al organismo en el futuro, si se enfrenta ante el mismo microorganismo (NCI, 2011).

En cáncer hay dos (2) tipos de vacunas: las profilácticas y las terapéuticas. Las vacunas profilácticas o preventivas, intentan prevenir el desarrollo de cáncer en personas sanas, y las vacunas terapéuticas o de tratamiento, intentan tratar un cáncer existente fortaleciendo las defensas naturales del cuerpo contra el cáncer, erradicando células infectadas o reduciendo su número. Existen dos (2) tipos de vacunas que están basadas en antígenos que transportan agentes infecciosos que son relativamente fáciles de ser reconocidos como extraños por el sistema inmune. El tipo más común de vacuna profiláctica está compuesto por partículas similares a virus (VLP), que son proteínas sintetizadas que se agregan a las estructuras ensambladas en la nueva cápside viral. Las vacunas terapéuticas generalmente están orientadas hacia el control de la respuesta inmune, mediada por antígenos, dirigidos hacia las proteínas E6 y E7 (Berry et al., 2003; NCI, 2011).

Las proteínas L1 y L2 que conforman la cápside del HPV, pueden interactuar con las moléculas superficiales de las células epiteliales humanas durante las etapas tempranas de la infección para conseguir entrar al DNA viral. Debido a que están presentes durante la etapa inicial constituyen un objetivo ideal para una vacuna profiláctica. Mientras se neutralizan los anticuerpos de ambas proteínas, se encuentran muchas más L1 que L2, y la respuesta inmune predominante es la de L1. Por lo tanto los estudios de varias vacunas profilácticas

candidatas están dirigidos hacia L1 más que hacia L2. Luego que el HPV se integra a células tumorales, las proteínas de la cápside no siempre están presentes, razón por la cual los objetivos L1 y L2 no son blancos confiables para vacunas terapéuticas. Las oncoproteínas E6 y E7, se expresan durante las etapas tardías de la enfermedad y están involucradas en la transformación maligna de las células infectadas por HPV, que luego conducen a crecimiento tumoral. Ellas se unen a genes supresores de tumores *p53* y *pRb*, respectivamente. Por ello, son objetivos primarios de vacunas terapéuticas, muchas de las cuales han sido diseñadas para tratar etapas tardías de la enfermedad. Las proteínas E1 y E2 son necesarias para replicar el HPV entre las células, antes que el virus se integre al DNA del huésped. Debido a que en etapas tempranas, E1 y E2 se expresan en niveles más altos que E6 y E7 en el progreso de la infección, varios investigadores sugieren que pueden ser mejores objetivos para una vacuna terapéutica diseñada para tratar etapas tempranas de la enfermedad, tales como las displasias de bajo grado (Berry et al., 2003; Garçon et al., 2011).

1.1.1.4. Sistema Inmune

La respuesta inmune ante patógenos depende de dos (2) importantes componentes: el antígeno para reconocimiento específico del patógeno por linfocitos T y B, y otros elementos estructurales del patógeno que proporcionan una señal de alerta para inducir una adecuada activación del sistema inmune innato. En las vacunas, la adición de adyuvantes incentiva la respuesta inmune causada por procesos de inactivación o purificación de los antígenos. Un adyuvante puede definirse como una sustancia que está preparada para mejorar la calidad y magnitud de una respuesta inmune, a través de la estimulación innata. La respuesta de los linfocitos T y B ante un patógeno, está dirigida por el encuentro inicial con el huésped y la activación de células inmunes innatas, a través de receptores específicos que reconocen motivos conservados comunes al virus. El proceso de seleccionar una adecuada combinación de antígenos y adyuvantes, considerando las especificidades del patógeno y el huésped, se vislumbra como un enfoque promisorio para la prevención de enfermedades y como un paso importante en el diseño racional de las vacunas (Garçon et al., 2011).

El sistema inmune ha inspirado varios desarrollos computacionales (Timmis et al., 2008). Algunos, partiendo de analogías biológicas, buscan resolver problemas de clasificación de datos, generando nuevos algoritmos. Otros, se enfocan en simular particularidades del mismo sistema.

Dentro de los trabajos que utilizan el sistema inmune como analogía, han sido orientados a la seguridad informática, optimización numérica y combinatoria, aprendizaje, bioinformática, procesamiento de imágenes y minería de datos. Trabajos como los que se mencionan a continuación son resultado de esta analogía: (a) basado en el proceso de generación de células-T en el sistema inmune, Forrest y colegas (Forrest et al., 1994), presentan un algoritmo inspirado en el proceso mediante el cual las células-T se someten a un proceso de censura, conocido como selección negativa, que sirve para eliminar linfocitos que podrían reaccionar de forma dañina contra proteínas propias que se expresan en el timo, permitiendo así el establecimiento de la tolerancia central y asegurando que las proteínas propias no serán atacadas por los linfocitos T. Su algoritmo opera de forma similar, diferenciando en el contexto computacional, lo propio de lo ajeno, como un método para la detección de virus informáticos; (b) inspirados en la teoría de selección clonal de inmunidad adquirida (Burnet, 1959), que explica cómo los linfocitos T y B mejoran su respuesta ante los antígenos, De Castro y colegas

(De Castro et al., 2002), proponen un algoritmo de propósito general denominado CLONALG, con dos (2) versiones: una orientada hacia el reconocimiento de patrones ejecutado con técnicas de aprendizaje de máquina, donde una población explícita de antígenos representa un conjunto de patrones de entrada, quedando como base de conocimiento disponible para el reconocimiento; y otra con base en características evolutivas, que se adapta para la resolución de problemas de optimización, enfatizando casos combinatorios y multimodales, sugiriendo posibles aplicaciones en problemas de clasificación, optimización de función multiobjetivo y simulación de sistemas adaptativos y complejos; (c) inspirado en la capacidad del sistema inmune para proteger el organismo contra antígenos y su potencial de diferenciación, Wang y colegas (Wang et al., 2009), presentan un modelo para la detección de virus informáticos mediante técnicas de aprendizaje de máquina; (d) basado en el proceso selectivo del sistema inmune Dixi y colegas (Dixit et al., 2011), presentan un algoritmo de optimización para evaluar el rendimiento de los sistemas basados en clasificaciones inspiradas en el sistema inmune artificial, utilizando para ellos técnicas de aprendizaje de máquina.

Dentro del segundo campo de aplicación, se encuentran trabajos orientados al modelamiento matemático del sistema inmune, algoritmos que simulan respuesta inmune frente a objetivos específicos e híbridos entre aplicaciones automatizadas y bancos de células donadas. Los trabajos que se mencionan a continuación hacen parte de este enfoque: (a) Tarakanov y colegas (Tarakanov et al. 2000), desarrollan un modelo matemático de las interacciones entre péptidos derivados de proteínas propias del sistema inmune y derivados de proteínas extrañas; (b) Wiah y colegas (Wiah et al., 2011), presentan un modelo matemático simplificado de respuesta inmune ante el virus de la Hepatitis B, enfocado en el control de la infección por los interferones, inmunidad innata y adaptativa; (c) Pappalardo y colegas (Pappalardo et al., 2011), implementan el modelo computacional SimB16 con el fin de capturar el comportamiento global del proceso de inmunoterapia B16-OVA, bajo la técnica de ABM, considerando tres (3) clases de parámetros: (i) los valores conocidos de la inmunología que proporciona la literatura estándar, (ii) parámetros estrictamente correlacionados con el escenario biológico que se desea simular, en este caso los parámetros que miden la dinámica del melanoma B16-OVA y su comportamiento e interacciones con el sistema inmune del huésped, y (iii) parámetros sin valores conocidos; (d) Sanofi (Sanofi Pasteur Lab, 2012), laboratorio desarrollador de vacunas, cuenta con un sistema referido como “ensayo clínico en un tubo de ensayo”, mediante el cual puede replicar respuestas del sistema inmune para vacunas e inmunoterapias, predecir la eficacia de las vacunas candidatas, determinar la dosis adecuada y el tiempo de administración, utilizando para ello entre veinte (20) y cincuenta (50) células donadas con diversos atributos que representan la población; (e) Microsoft (Microsoft Research, 2012), reporta un proyecto de investigación denominado “Modelamiento computacional del proceso del sistema inmune”, que en su primera fase se enfoca en la edición de péptidos en el complejo de histocompatibilidad mayor clase I (MHC-I), en el que se propone un mecanismo general de filtrado cinético que explica cómo el MHC-I es capaz de discriminar entre péptidos de diferentes afinidades.

1.1.1.5. Sistemas complejos

De una parte, los sistemas complejos (CS) han sido aplicados en procura de obtener descripciones de comportamientos globales, en lo cual generalmente ha sido utilizado el análisis de ecuaciones diferenciales; y de otra parte, se ha buscado interpretar interacciones entre los componentes de uno o varios sistemas, enfoque en el que generalmente se hace

uso de análisis a través de modelos basados en agentes (Ross et al., 2009; Merelli et al., 2015).

Algunas de las características relevantes de los sistemas complejos, incluye interacciones a partir de escalas cruzadas en tiempo y espacio, lo cual conduce a que el sistema no pueda ser descrito solamente por los atributos de las partes (Alaa et al., 2013). La interacción entre las partes puede conducir a la auto-organización del sistema (Kauffman, 1993) sin la necesidad de controles centrales, lo cual implica que interacciones locales puedan generar comportamientos emergentes (Luke, et al., 2012). Los sistemas complejos pueden experimentar retroalimentación y las acciones en un momento dado pueden implicar una posibilidad y una restricción en puntos del tiempo posteriores (Ross et al., 2009).

La mayoría de métodos de sistemas complejos permiten modelar a un nivel de heterogeneidad y diversidad en los componentes individuales, que no son modelados fácilmente usando métodos tradicionales, y permiten incorporar modelos en múltiples niveles, lo cual facilita que la estructura no se limite a los resultados de las políticas aplicadas a un solo nivel (Mitleton, 2003; O'Malley et al., 2014). También pueden involucrar comportamientos adaptativos y evolutivos, lo cual hace posible que un componente sea modelado para cambiar su comportamiento como resultado de una política, y además adaptarse y evolucionar su comportamiento a través del tiempo (Alaa et al., 2013; Furtado et al., 2015).

Entre algunos de los métodos usados en sistemas complejos (Mitchell et al., 2002), vale la pena destacar la no-linealidad, que se encuentra vinculada a las posibles interacciones que surgen entre los elementos de un sistema, que pueden dar lugar a un comportamiento emergente (Alaa et al., 2013); y el análisis de redes, que permiten el estudio de interacciones entre las partes (Rietman et al., 2011).

Dentro de las metodologías, las más comúnmente usadas son los autómatas celulares y los modelos basados en agentes (ABMs). Ambas metodologías, se asemejan en que utilizan agentes que siguen reglas y permiten simular las interacciones del sistema, que posteriormente conducen a propiedades emergentes; y se diferencian, porque los autómatas están fijos en el espacio y los ABMs pueden ser móviles. En los modelos basados en agentes, se puede modelar tanto estructuras fijas como móviles, y los agentes pueden ser vinculados a través de enlaces, semejando un análisis de redes (Mitchell et al., 2002; Rietman et al., 2011; Furtado et al., 2015).

Entre algunas de las propiedades que exhiben los sistemas complejos cuentan las interacciones entre agentes heterogéneos y el entorno a su alrededor, emergencia y auto-organización, no-linealidad y escalamiento, uso de reglas simples, énfasis en la dinámica y retroalimentación, nociones de adaptación, aprendizaje y evolución, todas ellas convierten a los sistemas complejos en una poderosa herramienta, con el potencial suficiente para asociar sus características, métodos y metodologías, a la caracterización de fenómenos biológicos de alta complejidad (Meyers, 2009; Furtado et al., 2015).

Por esencia los sistemas y procesos biológicos también son complejos. Los sistemas biológicos son ricos en información, y los procesos biológicos están más cerca de los conceptos de funcionalidad y sobrevivencia que de los de precisión y valor óptimo. Los métodos estocásticos han sido ampliamente reconocidos como un aspecto clave de la biología

molecular y celular. Existe un creciente interés en el entendimiento de los procesos de diferenciación celular y también en carcinogénesis, a partir de una perspectiva evolutiva a nivel celular. La teoría matemática de la evolución y poblaciones genéticas, se han basado en procesos estocásticos, por lo cual, enfoques físicos estocásticos en la dinámica bioquímica celular, proporcionan un esquema natural de trabajo para las ciencias biológicas. Un entendimiento cuantitativo basado en física estocástica de la biología celular, a su turno, proporciona un paradigma para el estudio de sistemas complejos (Qian, 2013).

1.1.1.6. Autómatas células y modelos basados en agentes

Los autómatas celulares y los modelos basados en agentes son dos (2) metodologías utilizadas en el modelamiento de computación avanzada, en aplicaciones de computación paralela y computación evolutiva (Baird et al., 2012; Bandini et al., 2006; Castiglione et al., 2007; Cheung et al., 2010; Ebeling et al., 2001; Genest et al., 2007; Hennacy, 2005; Jones et al., 2011; Macal et al., 2006; Maeda et al., 2007; Mata et al., 2007; Mente et al., 2011; Meyers, 2009; Misra, 1986; Öztürkeri et al., 2011; Palmius et al., 2010).

En el área de la biología, estas metodologías han sido utilizadas ampliamente en la simulación de procesos biológicos multicelulares, en procura de probar hipótesis científicas, planear experimentos, deducir relaciones entre propiedades de sistemas complejos para encontrar patrones mediados por reglas simples de comportamiento. Esta clase de modelos se han empleado para describir numerosos procesos del sistema inmune, ampliando el conocimiento en el campo de la inmunología y la patología de enfermedades. El trabajo de Celada y colegas (Celada et al., 1996), fue uno de los primeros esfuerzos por definir los mecanismos inmunes en un modelo basado en agentes, que planteaba como objetivo capturar la dinámica del sistema inmune y ejecutar experimentos in-silico. Desde entonces se han reportado varios trabajos de simuladores que permiten definir reglas de interacciones y mostrar reacciones inmunes, como por ejemplo: (a) IMMSIM (Baldazzi et al., 2006; Bernaschi et al., 2001; Bezzi et al., 1997; Celada et al., 1998; Kleinstein et al., 2000; Kohler et al., 2001), utilizado en aplicaciones para modelar la afinidad de maduración e hipermutación del sistema inmune humoral (Celada et al., 1996), para probar enfoques de diseños de vacunas (Kohler et al., 2001), y para investigar mecanismos de tolerancia ante factores patológicos reumatoídeos (Stewart et al., 1997); (b) SIMMUNE (Meier et al., 1999), presenta una herramienta para investigar cómo a partir de las interacciones célula-célula y célula-molécula, puede emerger el comportamiento adaptativo del sistema inmune. Este trabajo ha sido un importante referente en el Instituto Nacional de Alergias y enfermedades infecciosas (Bardi, 2012); y (c) SIS (Mata et al., 2007; Langman et al., 2003), basado en la descripción de los estados celulares y las transiciones entre estados, propone un modelo que permite observar respuestas del sistema inmune frente a los antígenos propios y ajenos.

Las siguientes metodologías también se han utilizado en la simulación de enfermedades generales, reproduciendo una variedad de interacciones huésped-patógeno: CyCells (Warrender et al., 2006), PathSim (Shapiro et al., 2008) y MASyV (Beauchemin et al., 2006; Beauchemin, 2012). Otros trabajos de simulación se enfocan en enfermedades particulares tales como: infección por HIV (Strain et al., 2002), Tuberculosis (Segovia-Juarez et al., 2004; Warrender et al., 2006), Epstein-Barr (Shapiro et al., 2008), influenza (Beauchemin et al., 2006), vacunas contra el cáncer (Motta et al., 2005; Pappalardo et al., 2005), y crecimiento e invasión tumoral (Alarcon et al., 2006; Zhang et al., 2007).

1.1.1.7. Algoritmos evolutivos

Los algoritmos evolutivos, son métodos de optimización basados en metáforas evolutivas que muestran ser efectivos en la resolución de problemas difíciles. Los algoritmos evolutivos se caracterizan de la siguiente forma: (a) tienen un conjunto de soluciones candidatas que son consideradas cada vez que se da un paso en el tiempo de una población única, (b) las soluciones candidatas son combinadas para formar unas nuevas (operador cruce), (c) aleatoriamente las soluciones pueden ser modificadas suavemente (operador mutación), y (d) las mejores soluciones, de acuerdo con los criterios de optimización (*fitness*), generan los ensayos más representativos (Yu-X et al., 2010).

En el campo de la vacunación, encontrar un protocolo óptimo requiere la construcción de modelos matemáticos y computacionales. El concepto de optimización ha sido tratado con diferentes estrategias: “ensayo y error”, “enfoque de recocido simulado” y “algoritmos genéticos”. Un ejemplo del primer enfoque se encuentra en el trabajo de Motta y colegas (Motta et al., 2005), en el cual reproducen los resultados obtenidos a partir de experimentos con ratones *in-vivo* sobre el gen HER-2/neu, miembro de la familia receptora de factores de crecimiento epidérmico, cuya sobre expresión se encuentra asociada a la progresión de ciertos tipos de cáncer de mama. Utiliza simulación por computador para buscar de forma sistemática un programa de vacunación que prevenga la formación de tumores sólidos. Ejemplo del segundo enfoque, se encuentra en el trabajo de Pennisi y colegas (Pennisi et al., 2008), el cual plantea una combinación entre el algoritmo de recocido simulado con estrategias heurísticas direccionadas biológicamente, para encontrar el plan de vacunación óptimo para la vacuna Triplex (diseñada por Lollini y colegas (Lollini et al., 2006), para mejorar la eficacia de tratamientos inmuno preventivos contra el carcinoma mamario). Con relación a los algoritmos genéticos, Pappalardo y colegas (Pappalardo et al., 2010), presentan un algoritmo que puede ser usado para el diseño de protocolos en vacunas, en la consecución de límites en términos de dosis y tiempo, y lo plantean como objetivo de investigación a largo plazo para el diseño de planes de vacunación.

1.1.2. Antecedentes

1.1.2.1. Vacunas para prevenir el virus de papiloma humano

La organización *Food and Drug Administration* (FDA), tiene aprobadas tres (3) vacunas para prevenir la infección por HPV: Gardasil y Cervarix, la primera producida por Merck & Co y la segunda por GlaxoSmithKline (GSK) (Garçon et al., 2011; Harper et al., 2010; McCormack et al., 2011; McKeage et al., 2011), y una tercera vacuna (Gardasil 9) fue aprobada en diciembre de 2014, para hombre y mujeres, que protege contra nueve (9) tipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58) (ACS, 2015).

Gardasil, es llamada cuadrivalente porque protege contra el HPV tipos 6, 11, 16 y 18. Ha sido aprobada para uso en mujeres para la prevención de cáncer cervical y algunos cánceres de tipo vulvar y vaginal; en hombres y mujeres para la prevención de lesiones anales pre-cancerosas y cancerosas, causados por HPV tipos 16 y 18, y también para la prevención de verrugas genitales causadas por HPV tipo 6 y 11. La vacuna está aprobada para estos usos en mujeres y hombres entre los nueve (9) y veintiséis (26) años. Cervarix, es llamada vacuna

bivalente porque sus objetivos son HPV tipos 16 y 18. Está aprobada para la prevención de cáncer cervical causado por HPV tipos 16 y 18, para uso en mujeres entre los nueve (9) y veinticinco (25) años.

Las vacunas no protegen contra todas las infecciones por HPV que causan cáncer de cuello uterino, ayudan a prevenir futuras infecciones pero no ayudan a eliminar las infecciones existentes causadas por HPV. Son muy efectivas en la prevención de la infección con los tipos de virus que cada una tiene como objetivo, solo si son aplicadas antes de presentarse la infección por HPV, y su máximo beneficio se obtiene si la persona recibe la vacuna antes de iniciar su actividad sexual. Las vacunas contra HPV funcionan como otras vacunas que protegen contra infecciones virales. Se cree que los componentes de la superficie del HPV pueden crear una respuesta de anticuerpos capaz de protegerlo contra la infección y que estos componentes podrían ser utilizados para formar la base de una vacuna. Estos componentes pueden interactuar entre sí para estimular el sistema inmune, haciendo que produzca anticuerpos que puedan prevenir el virus completo en futuros encuentros a partir de células infectadas (Harper et al., 2010; Kols et al., 2000; McCormack et al., 2011; McKeage et al., 2011; NCI, 2011a).

1.1.2.2. Vacunas para tratar cáncer

Otros investigadores se enfocan en vacunas terapéuticas para controlar el progreso de la enfermedad establecida o prevenir su recurrencia en mujeres que ya tienen displasia cervical o cáncer. El desafío que enfrenta el desarrollo de este tipo de vacunas se debe en parte a que el HPV evoluciona varias estrategias para evadir la respuesta inmune. Las vacunas terapéuticas están diseñadas para tratar cánceres que ya se han desarrollado, que intentan retrasar o detener el crecimiento celular para generar disminución o contracción del tumor, para prevenir que vuelva a aparecer o para eliminar células cancerosas que no han sido eliminadas por otras formas de tratamiento.

En cáncer, es frecuente que el sistema inmune no asocie las células cancerosas como extrañas o dañadas, como sí sucede con los microbios. Por lo tanto, el sistema inmune no prepara un ataque fuerte contra las células cancerosas. Varios factores hacen difícil que el sistema inmune se enfoque en el crecimiento del cáncer para su destrucción, entre algunos de ellos se considera el hecho que las células cancerosas transportan antígenos propios normales además de antígenos asociados a cáncer específico. Algunas veces, las células cancerosas se someten a cambios que pueden conducir a la pérdida de antígenos asociados a cáncer. Las células cancerosas pueden producir mensajes químicos que suprimen respuestas inmunes por la eliminación de células-T. Como resultado, cuando el sistema inmune reconoce un crecimiento de cáncer como una amenaza, el cáncer puede escapar a un fuerte ataque del sistema inmune.

Las vacunas para tratar el cáncer pueden buscar dos (2) objetivos. Primero, estimular respuestas inmunes específicas contra el objetivo correcto, como las vacunas preventivas y tradicionales. Segundo, procurar que las respuestas inmunes sean lo suficientemente poderosas para superar las barreras que las células cancerosas utilizan para protegerse de los ataques de células-B y eliminación de células-T. En abril de 2010, la FDA aprobó la primera vacuna para tratamiento en cáncer. Esta vacuna, sipuleucel-T (manufacturada por

Dendreon), está aprobada para uso en algunos hombres con metástasis por cáncer de próstata (Kantoff et al., 2010).

Uno de los desafíos en este campo es encontrar la forma de determinar cómo combinar múltiples antígenos dentro de una sola vacuna para el tratamiento del cáncer, que produzca respuestas inmunes anti-cáncer óptimas (Su et al., 2010; Lowy et al., 1998).

1.1.2.3. Prototipo modelo de crecimiento del HPV16

El trabajo elaborado previamente por (Escobar-Ospina, M.E., & Gómez-Perdomo, J., 2010), propone un modelo de crecimiento del virus de papiloma humano tipo 16 a partir de la caracterización de sus componentes en términos de reglas, interacciones y transiciones, procurando la identificación de puntos de control que marcan las diferentes etapas del ciclo celular, permitiendo la identificación de los reguladores críticos de entrada al ciclo de vida del virus, la pérdida de funciones, bien sea por anulación, mutación o interacción entre proteínas, y factores que pueden alterar el ciclo normal, generando condiciones de regresión o progresión.

El prototipo del modelo de crecimiento del Virus de Papiloma Humano Tipo 16, se construye sobre una malla hexagonal de células de dos (2) dimensiones, cuyas reglas gobiernan su crecimiento. Su comportamiento y ciclo de vida se resumen en el documento "Technical Report Alife_001: Caracterización biológica del virus del papiloma humano tipo 16" (Escobar, M.E., 2010a). Las reglas que definen el comportamiento del modelo, la lógica de implementación, el proceso de experimentación y los resultados obtenidos se encuentran detallados en documento de tesis de maestría "Modelo de crecimiento de las variantes del virus de papiloma humano tipo 16" y en el artículo, publicado en la revista "*Artificial Intelligence in Medicine*" (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013). Este modelo asume que el virus infecta los queratocitos basales primitivos por medio de pequeños desgarros (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010).

1.1.3. Justificación

La vacunación ha representado un logro exitoso en salud pública dado que ha permitido reducir la carga de enfermedades infecciosas en la población mundial. Las vacunas contra el cáncer son medicinas que pertenecen a una clase de sustancias conocidas como modificadores de respuesta biológica. Estos modificadores biológicos trabajan estimulando o restaurando la capacidad del sistema inmune para atacar las infecciones y la enfermedad.

Las vacunas profilácticas contra HPV, han mostrado una eficacia importante en la disminución de la incidencia en cáncer (ACS, 2012a; OMS, 2012; WHO/ICO, 2010), no obstante aún se encuentran evolucionando en respuesta a los desafíos que presentan continuamente los patógenos y el sistema inmune de cada individuo (Garçon et al., 2011). Uno de los desafíos actuales es diseñar vacunas terapéuticas para controlar la progresión a cáncer de cuello uterino cuando la infección se encuentra en grados de neoplasia cervical de alto riesgo.

Las vacunas son planeadas para inducir una respuesta del sistema inmune, de forma tal que encontrar un protocolo de vacunación óptimo requiere el apoyo de modelos computacionales

usando técnicas de vida artificial, que permitan la optimización de protocolos terapéuticos candidatos antes de realizar la validación *in-vivo*.

En resumen, la combinación del modelo de crecimiento del HPV16, mediante el cual se define el escenario biológico del virus, los agentes que simulan el comportamiento del sistema inmune, las vacunas que procuran inducir su respuesta, y las herramientas informáticas, utilizados en conjunto como elementos de apoyo para el control del HPV16 y su desarrollo a cáncer de cuello uterino, es un enfoque particularmente relevante en el control de esta enfermedad y en la posible reducción de costos que tal investigación implica en el mundo real.

Esta combinación de herramientas busca proporcionar una forma segura y eficiente en los procesos de investigación y desarrollo de vacunas terapéuticas, dado que podría permitir una reducción de costos importante al brindar la oportunidad de optimizar ensayos clínicos analizados previamente en el modelo, con lo cual se estaría ayudando a facilitar la investigación de nuevas estrategias de tratamiento, en lesiones de alto riesgo y cáncer de cuello uterino, causadas por infección persistente del HPV16, a través de vacunas terapéuticas.

1.2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

A lo largo del tiempo se han utilizado varias estrategias para controlar las enfermedades relacionadas con HPV, entre ellas las vacunas. Uno de los problemas en la conducción de investigaciones necesarias para el desarrollo de vacunas se encuentra en el uso de modelos animales, considerando que el HPV no causa enfermedad y no es infeccioso en ellos. Ninguno de los modelos animales simula completamente la interacción entre el HPV y las células del huésped humano, y es por ello que los estudios en animales se realizan con material humano inserto en huéspedes inmunológicamente suprimidos. Por ello, algunos investigadores consideran que no es claro si los resultados que se obtienen a partir de modelos animales apliquen de igual forma al evaluar la infección por HPV en humanos (Kols et al., 2000, Lowy et al., 1998), mientras otros indican que los modelos animales son eficaces para encontrar estrategias de vacunación que puedan ser usadas en prevención y tratamiento (Fausch et al., 2003).

Los protocolos de vacunación pueden ser definidos como óptimos si le permite garantizar la mejor tasa de supervivencia con el mínimo número de vacunas administradas. Es difícil y costoso poder asegurar la eficacia de los ensayos clínicos de vacunas en cáncer cervical debido a la lentitud del proceso, a la incertidumbre de desarrollar la enfermedad y a la variedad de tipos de HPV. El desarrollo de cáncer cervical después de la infección por HPV puede tomar varios años, no obstante la mayoría de mujeres presentan regresión de la enfermedad de forma natural y por tanto no la desarrollan. Así que medir la eficacia de ensayos clínicos de una vacuna candidata basados en su impacto sobre la incidencia de la enfermedad puede tomar varios años y el seguimiento de una gran cantidad de mujeres que no necesariamente desarrollarán cáncer cervical. Las vacunas que se usan actualmente no protegen contra todas las infecciones por HPV que causan cáncer, no ayudan a eliminar infecciones ya existentes y no se conoce la duración de la protección a largo plazo, requerido para prevenir cáncer. A pesar de los logros alcanzados con las vacunas preventivas existentes, su alto costo y la necesidad de refrigeración excluye su uso en países de bajos ingresos, justo donde el cáncer cervical reporta las más altas tasas de incidencia y

prevalencia. Estos aspectos, aunados al alto costo que implica la investigación en vacunas profilácticas y terapéuticas, generan una situación mucho más compleja para los gobiernos que buscan controlar la enfermedad y para los pacientes que la padecen.

Actualmente, se reportan cifras importantes de lesiones asociadas al HPV a nivel mundial. Las vacunas licenciadas son solo preventivas, es decir sin efectos terapéuticos. Estas son razones importantes que presionan la urgencia de desarrollar vacunas terapéuticas HPV para controlar las infecciones ya establecidas y asociadas a malignidad. Por todo ello, cobran mayor relevancia los aportes tecnológicos que se generen alrededor del tema y coadyuven al desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas para su control.

Con el fin de apoyar la investigación de vacunas que buscan controlar la infección causada por el virus de papiloma humano tipo 16 y el desarrollo de la enfermedad a causa de su persistencia, se pretende incorporar a un modelo de crecimiento del virus de papiloma humano tipo 16, previamente presentado (Escobar, M.E. & Gómez, J, 2010), agentes que permitan simular los estímulos de vacunas terapéuticas y las respuestas del sistema inmune humano, interactuando con el ciclo de vida del virus, procurando identificar protocolos de vacunación óptimos.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Plantear un modelo computacional para la predicción del efecto de una vacuna frente al ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16.

1.3.2. Objetivos específicos

- 1.3.2.1. Identificar los estímulos biológicos que se originan en vacunas contra el virus de papiloma humano tipo 16.
 - 1.3.2.2. Identificar las respuestas del sistema inmune frente al desarrollo del virus de papiloma humano tipo 16.
 - 1.3.2.3. Diseñar un modelo conceptual que permita definir la interacción entre el ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16 y las respuestas del sistema inmune.
 - 1.3.2.4. Desarrollar un prototipo de simulación que represente los estímulos de una vacuna, las respuestas del sistema inmune e incorporarlos a un modelo de crecimiento del virus de papiloma humano tipo 16.
 - 1.3.2.5. Realizar la validación experimental del modelo.
-

1.4. ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El documento que muestra el trabajo denominado “una aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus de papiloma humano tipo 16”, se presenta en seis (6) capítulos que conforma el documento de tesis y dos (2) libros anexos, que hacen parte integral del trabajo. El primer capítulo, hace una breve presentación de los antecedentes y la motivación que conduce a la definición del problema y a establecer los cinco (5) objetivos que serán el hilo conductor del trabajo de investigación.

El segundo capítulo, presenta información preliminar que busca conceptualizar los elementos claves que hacen parte del modelo de vida artificial propuesto. Se presentan conceptos relacionados con la teoría de sistemas complejos, sistemas biológicos, aplicaciones de vida artificial en la que cuenta la teoría de sistemas adaptativos complejos, modelos basados en agentes y autómatas celulares, dado que hacen parte de las técnicas computacionales en que se apoya la construcción del prototipo propuesto, y se muestran algunos sistemas biológicos que emplean estas técnicas. También se particularizan aspectos que permiten confrontar el sistema inmune biológico y el sistema inmune artificial, se presenta información del HPV16, refiriendo aspectos importantes relacionados con su estructura, clasificación y la respuesta del sistema inmune ante su detección. Adicionalmente, se presenta información relevante relacionada en el concepto de vacunas que procuran controlar enfermedades derivadas de la infección por HPV.

El tercer capítulo, presenta el modelo de vida artificial propuesto, explicando el proceso adelantado en la definición del diseño del modelo conceptual, en el cual se definen tres (3) microambientes que interactúan entre sí, y todos ellos interactuando con el ciclo de vida del HPV16.

El cuarto capítulo, detalla el proceso de construcción e implementación del prototipo funcional, en el que interactúan el ciclo de vida del HPV16, el sistema inmune, y la intervención de una vacuna terapéutica. Además, se incluye la descripción de las herramientas computacionales utilizadas en su construcción.

El quinto capítulo, detalla la experimentación realizada con el prototipo funcional y presenta los principales resultados conseguidos.

El sexto capítulo, expone las conclusiones del trabajo adelantado, las contribuciones realizadas y las recomendaciones para futuros trabajos.

Finalmente, se anexan dos (2) libros, donde se presentan los antecedentes biológicos que respaldan la definición del modelo conceptual propuesto y el desarrollo e implementación del prototipo funcional de vida artificial construido.

El primer libro anexo (Tomo I), denominado “visión holística del sistema inmune humano”, muestra componentes a nivel celular, claves para el sistema inmune humano. Incluye los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis celular. En particular, se consideran algunos antecedentes del sistema inmune, inmunología celular, desarrollo y diferenciación de monocitos, células-B, células-T, interacción entre células-B y células-T. Además, se presentan varios aspectos relacionados con los receptores Toll-like (**TLRs**) y secreción de citoquinas, frente al sistema inmune humano. Sobre este último aparte, se incluye específicamente:

estructura y clasificación de TLRs, señalización específica por cada TLR, familia de adaptadores, vías de señalización, otras moléculas involucradas en la señalización TLR, ciclo de vida TLR, e información relevante de cuarenta y siete (47) citoquinas, correspondientes a cinco (5) diferentes familias.

El segundo libro anexo (Tomo II), denominado “Visión holística del sistema inmune humano frente al virus de papiloma humano tipo 16”, presenta los antecedentes biológicos del sistema inmune interactuando con el virus de papiloma humano tipo 16, incluyendo los cambios celulares que ocurren en la respuesta inmune (innata y adaptativa), ante una infección causada por HPV. Específicamente, se refiere el ciclo de vida del HPV16 y su relación con el desarrollo de vacunas, así como también los procesos de interacción que surgen entre HPV, TLRs y citoquinas; TLRs y vacunas; y TLRs y cáncer.

1.5. ABREVIATURAS

ABM:	Agent Based Model
AIS:	Artificial Immune System
ALIFE:	Artificial Life
CA:	Cellular Automata
CAS:	Complex Adaptive System
CS:	Complex Systems
CSR:	Class-switch recombination
CIN:	Cervical Intraepithelial Neoplasia
E1-E7:	Early 1 – Early 7
HLA:	Human leukocyte antigen
HPV:	Human Papillomavirus
HPV:	Human Papillomavirus type 16
ILs:	Interleukins
L1-L2:	Late 1 – Late 2
MHC:	Major histocompatibility complex
SHM:	Somatic hypermutation
TLRs:	Toll-Like Receptors
VLP:	Virus-Like Particles

II PRELIMINARES

2 PRELIMINARES

El surgimiento del concepto de vida artificial fue motivado por la necesidad de modelar sistemas biológicos. El desarrollo en el campo de vida artificial ha estado estrechamente vinculado al modelamiento basado en agentes, y los modelos basados en agentes han sido considerados como una extensión natural de los autómatas celulares.

Todos estos conceptos han sido fundamentales en la interpretación de sistemas biológicos vistos como sistemas complejos, donde la aplicación de metodologías de vida artificial ha coadyuvado al conocimiento que actualmente se tiene de estos procesos, y a su vez, ha sido fuente de inspiración en la construcción de herramientas informáticas de propósito específico.

El presente capítulo resume éstos y otros conceptos, en aras de introducir los elementos y relaciones entre el mundo biológico que ha inspirado el modelo conceptual que se propone, y las herramientas computacionales que han permitido la construcción del modelo denominado “aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus de papiloma humano tipo 16”.

El presente capítulo está organizado en ocho (8) secciones. En las primeras tres (3) secciones, se presenta de forma muy general el enfoque de la teoría de sistemas complejos, teoría de sistemas biológicos y teoría de vida artificial, junto con las metodologías más comúnmente utilizadas. En la cuarta sección, se presentan antecedentes del sistema inmune biológico en humanos y su relación con el sistema inmune en el mundo artificial. La quinta sección muestra los efectos del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV16) y el impacto que tiene sobre el cáncer cervical, actualmente y proyectado al año 2030 en Colombia y en todo el mundo. Luego, en las secciones seis (6) y siete (7), se introduce la relación entre el sistema inmune, la detección del virus, y algunos de los enfoques que se han considerado frente al desarrollo de vacunas HPV16. La sección final, presenta un resumen del capítulo.

2.1. TEORÍA DE SISTEMAS COMPLEJOS

De acuerdo con Mitleton y colegas (Mitleton et al., 2003), las teorías de la complejidad proporcionan una estructura conceptual, una forma de pensar, y una forma de ver el mundo. Los autores afirman que el comportamiento complejo surge a partir de la inter-relación, interacción e inter-conectividad, entre los elementos de un sistema y entre el sistema y su entorno, y explican cada uno de los principios de la complejidad basados en las características genéricas de todos los sistemas complejos, incluyendo: (a) conectividad e inter-dependencia, (b) co-evolución, (c) estructuras disipativas, (d) exploración del espacio de posibilidades, (e) retroalimentación, (f) auto-organización, emergencia y creación de un nuevo orden, (g) caos y complejidad, (h) auto-similaridad. Otros autores presentan los sistemas complejos como sistemas que están conformados por partes que interactúan, con la capacidad de generar una nueva calidad de comportamiento colectivo a través de auto-organización, es decir, la

formación espontánea de estructuras temporales, espaciales o funcionales. También se presentan como sistemas adaptativos ya que evolucionan y pueden contener ciclos de retroalimentación auto-dirigidos. Los sistemas complejos son mucho más que la suma de sus partes. Se caracterizan por tener extremada sensibilidad a las condiciones iniciales así como también al comportamiento emergente que no es fácilmente predecible. Se destaca además, que ha sido reconocido el hecho que el comportamiento colectivo de todo el sistema no puede ser simplemente inferido a partir del entendimiento del comportamiento de sus componentes individuales, y esto conduce a conceptos y herramientas de modelamiento descritas en términos de complejidad y sistemas complejos (Meyers et al., 2009; Mitchell et al., 2002).

Los sistemas complejos exhiben patrones de emergencia que no son predecibles a partir de la inspección de los elementos individuales. La emergencia se describe como algo inesperado, impredecible o sorprendente. Esto quiere decir que los sistemas modelados exhiben comportamientos que son explícitamente construidos en el modelo. La impredecibilidad se debe a los efectos no-lineales que resultan de las interacciones de entidades que tienen comportamientos simples (Meyers et al., 2009). Los sistemas complejos adaptativos (CAS), se definen como una colección de componentes o agentes individuales, con libertad para actuar en formas que no son totalmente predecibles, y cuyas interacciones se entrecruzan en tal forma, que por medio de estas interacciones, un agente puede afectar las condiciones en las que otros agentes actúan (Martínez et al., 2013). Entre algunas de las propiedades más comunes se destacan: (a) poseer estructuras de múltiples agentes, (b) auto-organización (c) co-evolución, (d) emergencia, y (e) adaptación (Ellis et al., 2011; Pathak et al., 2007).

Los sistemas complejos biológicos son también denominados sistemas adaptativos porque tienen características de adaptación a un medio ambiente cambiante (Katz, 2015). La dinámica de un sistema complejo se ve afectada por procesos de retroalimentación que pueden ser positivos o negativos. Regularmente, la retroalimentación positiva incrementa la dinámica del sistema, y la negativa hace exactamente lo opuesto. La cooperación en sistemas complejos involucra flujos de señales que permiten activar la dinámica del sistema mientras se mueven a través de éste. Los modelos en red han permitido implementar esquemas muy útiles para el estudio de sistemas complejos toda vez que permite la visualización de características cooperativas. En estos sistemas, las interacciones en red pueden ser conducidas por flujos de información a través de la red (en biología por ejemplo, genes objetivos no necesariamente son sus propios factores de transcripción), o por flujos no-dirigidos (en el caso biológico, tales como la red de interacciones a nivel de proteínas), en los cuales los agentes interactúan por medio de relaciones asimétricas (Martínez et al., 2013; Pathak et al., 2007).

2.2 TEORÍA DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

En biología se ha planteado que los sistemas siempre han estado presentes. Diferentes disciplinas, entre las que se cuenta la inmunología, sugieren que las herramientas matemáticas son importantes cuando se pasa de identificar los componentes a entender su funcionamiento colectivo (Gunawardena, 2010). La integración de datos y la construcción de modelos han llegado a ser actividades esenciales en los avances de la investigación, tanto biológica como tecnológica. La comunidad científica sugiere que la forma fundamental en la cual la biología es construida, puede cambiar el orden para aprovechar la gran cantidad de datos biológicos que se encuentran disponibles, y se indica que el aprovechamiento de esta información es fundamental para promover el objetivo de mejorar la salud humana y mejorar el

entendimiento de los mecanismos subyacentes a la vida. Como prioridades en salud se señala la integración de conjuntos de datos biológicos heterogéneos, la integración de experimentos y computación, y el desarrollo de métodos para análisis de sistemas en biología. Todos estos objetivos de alta prioridad para la integración de datos biológicos pueden ser reunidos a través de la creación de modelos de sistemas biológicos (Meyers, et al., 2009).

Los sistemas biológicos con frecuencia constan de grandes cantidades de componentes, y su principal desafío lo constituye realizar cualquier análisis, toda vez que los procesos que los gobiernan no son lineales, lo cual permite un enorme repertorio de diferentes comportamientos con los cuales un organismo puede responder ante una perturbación. Frente a una enfermedad, otras dificultades aparecen ya que su surgimiento no obedece a una sola causa, sino que puede ser la consecuencia de una combinación de leves alteraciones en varios componentes (Voit et al., 2012). Tal es el caso que se presenta con las enfermedades que se originan en la infección por HPV16, donde muchas de las respuestas tardan, por el orden de años, con relación al momento del estímulo, lo cual puede implicar el estudio no solamente del estado actual del sistema biológico sino también de su historia, esto es, que la recuperación de una infección severa depende ampliamente de las pre-condiciones del organismo, que pueden ser el resultado colectivo de infecciones tempranas y de las respuestas del cuerpo ante su detección.

La cuantificación de la complejidad de un organismo biológico puede estar agrupada en varias categorías: estructural, funcional, de secuencia, y de red. En una medida de complejidad estructural, normalmente se intenta contar el número de partes y sus conexiones. Los desafíos se presentan al definir un escalar que clasifique todas las posibles estructuras y no es necesariamente predictivo de la función compleja, aunque se espera que sea cierta en la mayoría de los casos. Idealmente, la medida de complejidad biológica podría ser funcional, es decir, reflejar cómo funciona el organismo en un mundo complejo. Debido a las obvias dificultades relacionadas, ya sea con la forma de funcionar o la secuencia de su funcionamiento, las mediciones basadas en su función están menos bien formadas que algunas basadas en su estructura. Debido a que la función es entendida como un producto de selección natural, con frecuencia se asume implícitamente que una medida de la complejidad funcional podría resultar en evolución. Regularmente, este tipo de medición se basa en la teoría de la información. Respecto a la complejidad de secuencia, todas las formas de vida sobre la tierra contienen un código genético que es responsable por la generación de su forma y función. Debido a las limitaciones para usar la longitud de la secuencia completa, el enfoque para las mediciones de complejidad de secuencia se ha enfocado en mediciones matemáticas, o más específicamente sobre la complejidad de cadenas simbólicas que ha derivado en algunas teorías como: Kolgomorov, composicional o de la información. La dificultad en la evaluación de la complejidad de redes biológicas surge porque usualmente tienen miles de nodos y varios miles de fronteras, y con frecuencia parecen ser no estructuradas. La mejor forma para evaluar la complejidad de una red es medir la complejidad del conjunto de reglas usadas para construirla. En biología, este conjunto de reglas están codificadas en el genoma, así que un primer estimado del orden de la complejidad de una red podría ser dada por la complejidad del genoma que lo produce (Meyers et al., 2009). Las escalas de tiempo y espacio, también representan un desafío, dado que los sistemas biológicos pueden simultáneamente operar en diferentes escalas. La escala temporal se ve gobernada por procesos físicos y químicos, que ocurren en fracciones de milisegundo y tiempos menores. Los procesos bioquímicos pueden correr en escalas de tiempo de segundos a minutos. El ciclo de vida del HPV, por ejemplo, puede tomar años. Por lo tanto, el esfuerzo

de modelar procesos biológicos frente a la escala de tiempo puede resultar bastante simplificado. En cuanto a la escala espacial, todos los procesos biológicos tienen un componente molecular y su escala puede ser del orden de Ångström (en 1 cm caben 10 millones de Å) o nanómetros ($1 \text{ nm} = 1 \text{ mil millonesima parte de un metro}$). A nivel celular, se puede tratar con una escala de micrómetros ($1 \mu\text{m} = 1 \text{ millonesima parte de un metro}$) a milímetros (1 milésima parte del metro), y en algunos casos de excepción en centímetros. A partir de esta variabilidad en las escalas espaciales, los modelos de sistemas biológicos con frecuencia se enfocan en una (1) o dos (2) escalas de espacio y tiempo, lo cual puede resultar en un nuevo desafío en la construcción de este tipo de modelos (Voit et al., 2012), y es por ello que ciertas características y propiedades pueden ser únicamente conocidas por el nivel de distribución de probabilidades, por lo que es natural incorporar estocasticidad en modelos de tales sistemas (Meyers et al., 2009).

En los sistemas biológicos, la emergencia es un evento central, ya sea la emergencia del fenotipo a partir del genotipo, la emergencia de complejos de proteínas a partir de redes de información genómica, o la emergencia de la conciencia a partir de redes de millones de células cerebrales (Meyers et al., 2009). Los modelos resultantes de sistemas biológicos se presentan en dos (2) variedades. Unos se enfocan en sistemas específicos, los cuales incluyen todos los detalles funcionales y numéricos. El segundo tipo de modelos, intenta ayudar a entender las características fundamentales y genéricas de la organización de los sistemas biológicos. La oportunidad para los sistemas biológicos resulta de la confluencia de tres (3) fronteras científicas. La primera, es el curso de la rápida y vasta acumulación de información biológica detallada a nivel fisiológico, celular, molecular y sub-molecular, los cuales incluyen cuantificación del genoma, patrones de expresión, identificación de proteínas, caracterización de las interacciones de redes moleculares y evaluación global del sistema inmune, entre otros sistemas de seres vivos. La segunda frontera, resulta de la innovación en otros campos de la ciencia que han permitido el surgimiento de técnicas que ayudan a probar, detectar y medir. Tal es el caso de la bioingeniería y la robótica, que han ayudado a medir miles de biomarcadores en el torrente sanguíneo, lo cual ha coadyuvado a los propósitos que busca la medicina, los medicamentos y la biotecnología. La tercera frontera, es la co-evolución de la matemática, física y técnicas computacionales. El avance en la algoritmia ha permitido la simulación y optimización de flujos biológicos muy complejos, y han permitido la aproximación a la dinámica de sistemas complejos no-lineales, los cuales son fuente primordial para la predicción, lo que a su turno sugiere prometedoras intervenciones en medicamentos y vacunas (Voit et al., 2012).

2.3. VIDA ARTIFICIAL

Varios enfoques han sido referidos para describir la vida artificial. Inicialmente, fue descrita como “el estudio de sistemas hechos por el hombre que exhiben comportamientos característicos de sistemas vivientes” (Langton, 1989). En 1994 fue presentado un enfoque más sintético que reduccionista de la vida artificial, en que se busca describir una forma de vida artificial que exhibe evolución natural. Es así que se presenta el concepto de vida artificial, como una iniciativa para el entendimiento de la biología, mediante la construcción de los fenómenos biológicos a partir de componentes artificiales, y no como una forma de separar las formas de vida naturales entre las partes que la componen (Ray, 1994). La vida artificial (ALife), fue inicialmente motivada por la necesidad de modelar sistemas biológicos y trajo consigo la necesidad de computación. Siendo un campo multidisciplinario, cubre una variedad

de tópicos a partir de diferentes disciplinas que incluyen elementos esenciales de la vida biológica y la vida artificial, orígenes de la vida y auto-organización, dinámica evolutiva, replicación y desarrollo de procesos, aprendizaje y evolución, emergencia, computación y sistemas vivos, y sistemas de simulación para estudiar la vida artificial, entre muchas otras (Meyers et al., 2009).

En 1989 Langtom (Langtom, 1989), resume la esencia de la vida artificial en las siguientes características: comportamiento semejante a la vida, en partes de sistemas hechos por el hombre, entidades semiautónomas cuyas interacciones locales con otros son gobernadas por un conjunto de reglas simples, poblaciones más que individuos, especificaciones más simples que complejas, control local más que global, modelamiento de abajo hacia arriba más que de arriba hacia abajo, comportamiento emergente más que pre-definido (Meyers et al., 2009).

Actualmente la investigación en vida artificial puede ser clasificada en catorce (14) temas que incluyen el origen de la vida, autonomía, auto-organización, adaptación (evolución, desarrollo y aprendizaje), ecología, sociedades artificiales, comportamiento, biología computacional, química artificial, información, tecnología viviente, arte y filosofía (Aguilar et al., 2014). La vida artificial ha motivado muchos modelos computacionales basados en agentes de sistemas biológicos, y el modelamiento basado en agentes, como un mecanismo de vida artificial, ha sido aplicado al entendimiento de los sistemas biológicos. La vida artificial es un enfoque para estudiar sistemas biológicos que intenta inferir mecanismos a partir del fenómeno biológico, sumando la elaboración, refinamiento y generalización de estos mecanismos, para identificar propiedades dinámicas unificadas de estos sistemas. Dentro de las características esenciales de un programa de vida artificial se incluye: (a) una población de diversos organismos o individuos en los que pueden variar sus características, comportamiento, recursos en tiempo y espacio; (b) interacciones que requieren la detección del medio local o del vecindario, por parte de un individuo y las interacciones con el entorno; (c) sostenimiento y renovación que requiere la adquisición de recursos que pueden ser proporcionados por el entorno o por otros agentes; (d) auto-reproducción y reemplazo, donde el organismo puede ser transformado a través de cambios en sus atributos y comportamientos, lo cual puede ocurrir a través de la introducción de nuevos organismos y reemplazos (Meyers et al., 2009).

El campo de la vida artificial está íntimamente conectado al modelamiento basado en agentes (ABM). El modelamiento ABM ha crecido alrededor de la necesidad de modelar lo esencial de la vida artificial, y muchos de los aspectos de la vida artificial han sido incorporados al desarrollo de modelos basados en agentes.

2.3.1. Autómatas celulares

En 1985 Wolfram (Wolfram, 1985), señalaba que los autómatas celulares (CA) pueden actuar como computadores universales capaces de concebir los más complicados comportamientos, y aunque sus estructuras son simples, su comportamiento general puede ser tan complejo como en cualquier sistema. Los CA también han sido presentados como una excelente manera de formalizar una teoría de supuestos mecanismos en términos computacionales y como un importante primer paso en el entendimiento de cualquier proceso físico, que mediante simulaciones permite decidir qué propiedades son necesarias en la ocurrencia de algún fenómeno natural, tal como lo hizo Ermentrout en 1993 (Ermentrout et al., 1993). Ambos

autores, desde entonces ya concebían esta herramienta como un importante jugador de la biología teórica.

Los autómatas celulares (**CA**) se definen como sistemas dinámicos discretos, en los que un arreglo extendido de símbolos a partir de un alfabeto finito, es iterativamente actualizado, de acuerdo con reglas locales previamente especificadas (Deng et al., 2014). Un CA es determinístico en el sentido que el mismo estado para una célula y su conjunto de vecinos, siempre resulta en el mismo estado actualizado para la célula (Santé et al., 2010).

Varios de los modelos CA surgen a partir de esfuerzos por entender la auto-organización biológica, los cuales a su turno también encuentran usos específicos en algunos aspectos de la biología (Ermentrout et al., 1993). Los autómatas celulares han sido fundamentales en el desarrollo de modelos computacionales de vida artificial, con diferentes aplicaciones en modelos de crecimiento, formación de patrones biológicos, secuencias DNA e interacciones genéticas, patrones de reconocimiento, entre otras muchas aplicaciones (Meyers et al., 2009).

2.3.2. Modelos basados en agentes

En el modelamiento basado en agentes (**ABM**), los autómatas celulares representan el vecindario del agente mediante el uso de una malla en la cual los agentes existen en las células, visto como un agente por célula. Las células que rodean un agente, conforman el vecindario del agente y los agentes que residen en las células del vecindario, conforman los vecinos, por lo cual los ABM son considerados como una extensión natural de los modelos semejantes a los autómatas celulares.

Una importante característica de los ABMs, que los diferencia de los CA, es la potencial asincronía de las interacciones entre agentes, y entre los agentes y sus entornos. Los agentes interactúan con un conjunto de agentes vecinos en un área local. Los vecindarios de agentes están definidos por la forma en que los agentes están conectados. Generalmente, un sistema basado en agentes está conformado por agentes que interactúan, se adaptan y se sostienen por sí mismos, mientras interactúan con otros agentes y se adaptan a un medio ambiente cambiante. Los agentes tienen comportamientos que los hacen entidades activas más que pasivas, que les permite tomar información del medioambiente, lo cual incluye sus interacciones con otros agentes, procesan la información y toman algunas decisiones acerca de la siguiente acción. La población de agentes varía a través del tiempo, tienen acceso a información local y obtienen información acerca del resto del mundo, solamente a través de sus interacciones con una cantidad limitada de agentes a su alrededor, en cualquier punto del tiempo, y a partir de una ubicación local del entorno en el cual está situado (An et al., 2009; Helbing et al., 2012; Meyers et al., 2009). Los ABM también son modelos estocásticos que revelan dinámicas únicas a partir de configuraciones espaciales muy específicas o a partir de raros eventos localizados, que podrían ser omitidos con otros enfoques. Particularmente, esta característica resulta ser valiosa en los resultados que se obtienen de procesos infecciosos sobre diferentes individuos, en diferentes puntos del tiempo (Bauer et al., 2009).

De acuerdo con Meyer y colegas, las características de los agentes pueden ser resumidas de la siguiente forma: (a) los agentes son identificables como individuos independientes que tienen un conjunto de características y reglas que gobiernan su comportamiento; (b) son autónomos y pueden funcionar independientemente de su entorno y en sus interacciones con

otros agentes, por lo menos en algunas situaciones de interés; (c) el agente tiene la capacidad de reconocer y distinguir los rasgos de otros agentes, cuentan con protocolos para interactuar con otros agentes y tienen la capacidad de responder al entorno; (d) puede ser dirigido a una meta, teniendo objetivos por alcanzar con relación a su comportamiento; (e) puede tener la capacidad de aprender y adaptar su comportamiento basado en sus experiencias, y puede tener reglas que modifiquen su comportamiento a través del tiempo (Meyers et al., 2009).

De acuerdo con Helbing y colegas (Helbing et al., 2012), los modelos basados en agentes se clasifican en modelos físicos, modelos económicos y modelos sociológicos. Uno de los objetivos que se plantea en simulaciones de sistemas biológicos modelados por ABM, es la generación de poblaciones de los componentes de los sistemas simulados y de sus interacciones, procurando pasar de un mundo virtual a crear un modelo experimental *in-silico*. Entre las características que presentan An y colegas (An et al., 2009), se destacan las siguientes propiedades de los ABM: (a) la naturaleza espacial de los ABMs soportan modelamiento de agentes con limitaciones conocidas, introducidas mediante reglas de localidad que determinan el entorno inmediato. El énfasis del comportamiento conduce a interacciones locales, que coinciden estrechamente con los mecanismos de estímulo y respuesta observados en la biología; (b) cada clase de agente tiene múltiples manifestaciones, como un objeto computacional formando una población de agentes que interactúan en un entorno de procesamiento paralelo. Diferentes condiciones locales conducen a diferentes trayectorias del comportamiento de los agentes individuales; (c) particularmente, los sistemas biológicos incluyen comportamientos que pueden ser aleatorios a nivel observacional, pero pueden ser totalmente determinísticos desde un punto de vista matemático; (d) pueden tener una estructura modular, donde nueva información puede ser adicionada a través de nuevos tipos de agentes o mediante la modificación de reglas ya existentes, sin necesidad de rediseñar la simulación completa; (e) reproducen propiedades emergentes, debido al paralelismo, estocasticidad intrínseca, y reglas de agentes limitadas localmente, que les permite generar una dinámica sistémica que no podría ser inferida a partir del examen de las reglas de los agentes individuales; (f) pueden ser construidos en ausencia de un conocimiento completo.

El modelamiento de una población de agentes heterogéneos con un conjunto de características diversas, es una marca que distingue un ABM. La perspectiva del agente es única entre los enfoques de simulación, a diferencia de la perspectiva de procesos o del enfoque variable-estado, tomado por otros enfoques de simulación (An et al., 2009; Meyers et al., 2009). El modelamiento basado en agentes, es un enfoque de abajo hacia arriba para modelar e investigar sistemas complejos, para representar explícitamente los comportamientos de grandes cantidades de agentes y los procesos por los cuales interactúan. Estas características esenciales son todas necesarias para producir al final formas rudimentarias de comportamiento emergente a nivel de sistema (An et al., 2009; Hwang et al., 2009; Meyers et al., 2009).

Una de las motivaciones del modelamiento basado en agentes es explorar el comportamiento emergente exhibido por el sistema simulado. En general, ABM con frecuencia exhibe patrones a partir de la interacción entre agentes del sistema (Bauer et al., 2009; Helbing et al., 2012; Meyers et al., 2009). Un aspecto importante para usar ABMs como una estructura de modelamiento integral, que se mueve hacia el objetivo de representar un conocimiento dinámico, es la facilidad que se logra en trasladar modelos conceptuales apoyados en investigación biomédica a formas ejecutables. Los ABMs tienen la ventaja de mapear bien los

medios por los cuales el conocimiento biomédico se expresa actualmente, y es generalmente más intuitivo para científicos de la computación y no-matemáticos (An et al., 2009).

2.4. SISTEMA INMUNE

De acuerdo con “*American Cancer Society*” (ACS), el sistema inmune es una colección de órganos, células y sustancias especiales, que ayudan a proteger al huésped de infecciones y otras enfermedades. Las células inmunes y las sustancias viajan a través del cuerpo para protegerlo de gérmenes que causan enfermedad y también ayudan en la protección contra el cáncer (ACS, 2015). El sistema inmune biológico es considerado un sistema complejo. Sus capacidades han permitido la construcción de sistemas automatizados que simulan de alguna manera, varias de sus propiedades, y esto ha dado origen a un campo de la investigación que ha tomado el nombre de sistema inmune artificial (AIS) (Meyers et al., 2009).

2.4.1. Sistema inmune biológico

El sistema inmune humano está compuesto de una gran diversidad de conjuntos de células, moléculas, interacciones y procesos, los cuales generan comunicación con otros sistemas tan complejos como él mismo, entre los que se cuenta el sistema nervioso, endocrino, respiratorio, circulatorio y otros tantos, todos ellos trabajando en procura de mantener un estado estable dentro del huésped. El rol principal del sistema inmune es defender al huésped de agentes infecciosos entre los que se cuentan virus, bacterias, hongos y parásitos.

Existen dos (2) tipos de inmunidad, innata y adaptativa. La inmunidad innata constituye un primer mecanismo de defensa y tiene un rol destacado en la iniciación y regulación de la inmunidad adaptativa. El sistema inmune adaptativo, cuenta dentro de sus poblaciones celulares con los linfocitos, los cuales corresponden a células rojas y blancas, más específicamente poblaciones de células-T y células-B, que ayudan en procesos de reconocimiento y respuestas específicas.

El sistema inmune es considerado un paradigma emergente que tiene como objetivo un entendimiento sistemático y cuantitativo, y en este orden se ha buscado, de una parte, determinar los componentes moleculares, celulares e interacciones, basado en colección de datos imparciales, donde se utilizan mediciones de alto rendimiento que se apoyan en tecnología biomédica, siendo este enfoque comúnmente denominado “modelamiento basado en datos”; y de otra parte, entender los principios de su funcionamiento mediante la formulación de hipótesis basada en datos, enfoque que ha conducido al planteamiento de modelos matemáticos que ayudan a explicar y predecir la dinámica del sistema, enfoque comúnmente denominado “modelamiento basado en hipótesis”. Arazi y colegas (Arazi et al., 2013), consideran que la interacción entre estos dos (2) enfoques puede ser fundamental en el futuro desarrollo de la biología y la medicina.

En el primer capítulo del libro anexo-1 (visión holística del sistema inmune humano), numerales 1.1 y 1.2, se explica en detalle los antecedentes biológicos de este complejo sistema, incluidas las teorías y postulados que han contribuido al desarrollo de su conocimiento, se detallan los diferentes tipos de inmunidad y se presentan los componentes claves que participan en sus procesos de activación y elaborados mecanismos de defensa.

2.4.1.1. Diferenciación, proliferación y apoptosis celular

Algunas células especializadas del sistema inmune evolucionan para reconocer y unirse a patrones moleculares encontrados en microorganismos, y otras son modificadas para exponer a tales invasores al control del sistema inmune. Estas células a través de varios mecanismos de interacción que les permite diferenciarse, proliferar y programar ciclos de muerte natural, también les permite desencadenar diferentes respuestas, que ayudan al reconocimiento y destrucción de sustancias específicas, lo cual hace parte de la dinámica que requiere el sistema inmune para activar sus mecanismos de defensa.

En el primer capítulo del libro anexo-1, numerales 1.3–1.6, se muestra el proceso de desarrollo de algunas poblaciones celulares, y se explica cómo se dan los procesos de diferenciación e interacción entre las diferentes poblaciones celulares que intervienen en el sistema inmune biológico humano, las cuales hacen parte del modelo de vida artificial que se propone.

2.4.1.2. Receptores Toll-like (TLRs)

Los receptores Toll-like (TLRs), son una clase de receptores de reconocimiento de patrones capaces de identificar patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) y patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs), los cuales hacen parte de un mecanismo de alerta que le permite al sistema inmune preparar y activar sus mecanismos de defensa. Hasta el momento, se han identificado diez (10) de sus miembros (TLR1—TLR10) tanto en humanos como en ratones, y dos (2) más (TLR11 y TLR13) solamente en ratones (Uniprot, 2015).

En el segundo capítulo del libro anexo-1, numerales 2.1–2.6, se muestra el detalle de los antecedentes biológicos correspondientes a las vías de señalización de cada uno de los TLRs humanos, detallando sus adaptadores y componentes moleculares. Adicionalmente, en el cuarto capítulo del libro anexo-2 (visión holística del sistema inmune humano frente al virus de papiloma humano tipo 16), numerales 4.1, 4.2 y 4.4-4.7, se reportan las interacciones que surgen entre los receptores TLRs y el ciclo de vida del HPV16. También, se considera la participación de TLRs en el desarrollo de cáncer y en el diseño de vacunas, aspectos considerados en el modelo de vida artificial que se propone.

2.4.1.3. Producción de Citoquinas

Las citoquinas son químicos elaborados por algunas células inmunes, que resultan ser fundamentales en el control del crecimiento y en la actividad de otras células inmunes y células sanguíneas (ACS, 2015). Son jugadores claves de la respuesta inmune y por tanto tienen una destacada participación en el entendimiento de aspectos fisio-patológicos en enfermedades humanas, por lo cual el estudio de sus redes y vías de señalización han interesado a la comunidad científica. Actualmente las citoquinas participan de forma importante en la investigación y desarrollo de nuevos enfoques de inmunoterapia en cáncer (ACS, 2015a).

En el tercer capítulo del libro anexo-1, numerales 3.1-3.3, se reporta el detalle de antecedentes biológicos de cada una de las citoquinas involucradas en respuestas inmunes

humanas, destacando los procesos de interacción celular en los que participan, su relación específica con ciertas TLRs y funciones frente a la inmunidad innata y adaptativa. Adicionalmente, en el cuarto capítulo del libro anexo-2, numeral 4.3, se detalla el rol específico de las citoquinas ante la infección por HPV16, su comportamiento funcional durante el desarrollo de cáncer, y su participación en ambientes tumorales y en diseño de vacunas.

2.4.2. Sistema inmune artificial

Características tales como robustez, adaptabilidad, diversidad, escalabilidad, interacciones múltiples en variedad de escalas de tiempo, son algunas de las propiedades del sistema inmune biológico, que el sistema inmune artificial ha deseado poseer. El sistema inmune artificial ha buscado capturar la dinámica del sistema inmune biológico (Castiglione et al., 2011). Con base en ello, el sistema inmune artificial (AIS), ha permitido la construcción de algoritmos inspirados en inmunidad, aplicados a problemas tales como control robótico (Daudi, 2015), detección de intrusión en redes (Zeeshan et al., 2015), tolerancia a fallas (Khan et al., 2008), bioinformática (Nigam et al., 2012), aprendizaje de máquina (Saybani et al., 2015), control de virus informáticos (Onomza et al., 2015), entre otras varios algoritmos bio-inspirados.

Los algoritmos biológicamente inspirados requieren seguir por lo menos tres (3) elementos básicos: (a) una representación para los componentes del sistema, (b) un conjunto de mecanismos para evaluar las interacciones de individuos con el entorno, y viceversa, y (c) procedimientos de adaptación que gobiernen la dinámica del sistema, es decir, la forma en que varía su comportamiento a través del tiempo. El conjunto de mecanismos para la evaluación, son las medidas de afinidad; y los procedimientos de adaptación, son los algoritmos inmunes (Garret, 2005; Meyers et al., 2009).

Los principales desarrollos AIS se han enfocado en tres (3) teorías muy importantes en inmunología: selección clonal, redes inmunes, y selección negativa. Estas teorías han estimulado trabajos orientados a los mecanismos de aprendizaje y memoria del sistema inmune para la generación de detectores y clasificadores. Varios algoritmos de optimización, reconocimiento de patrones, control de virus informáticos (Onomza et al., 2015), aprendizaje estático y dinámico, han sido inspirados en la selección clonal (Rai et al., 2015). Diseño de herramientas de agrupamiento jerárquico, métodos de sistemas difusos, algoritmos de rendimiento y predicciones, han sido inspirados en las redes inmunes (Ali et al., 2015). Muchos de los algoritmos de detección de intrusión, mecanismos de seguridad y control antivirus (Zeng, 2015), han sido inspirados en selección negativa, entre otros enfoques.

Construir un sistema inmune artificial (AIS) completo, requiere un enfoque interdisciplinario (biología, matemática y computación), que emplee el modelamiento de la inmunología en orden a entender la complejidad subyacente e inherente al sistema inmune. AIS no es rival de su contraparte natural, ya que ambos exhiben el mismo nivel de complejidad o realizan la misma función, pero AIS no captura propiedades esenciales del sistema inmune biológico lo que lo convierte en un paradigma de inteligencia computacional competitiva (Meyers et al., 2009). No obstante, las aproximaciones que se realicen ayudarán en el mejor entendimiento de la relación entre sistema inmune y enfermedad, y en este caso en particular, un mayor entendimiento de la respuesta inmune ante infecciones causadas por HPV16.

2.5. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO TIPO 16 (HPV16)

El virus de papiloma humano origina la infección de transmisión sexual más común en el mundo. La infección persistente por tipos oncogénicos de HPV es uno de los pre-requisitos para el desarrollo de cáncer cervical. El HPV tipo 16 (HPV16), es uno de los más comunes en cáncer cervical invasivo, representando cerca del setenta por ciento (70%) de todos los cánceres cervicales, y también incide en cánceres anales, peniles, vaginales, vulvares y orofaríngeos. Más del ochenta por ciento (80%) de los casos de cánceres cervicales ocurren en regiones menos desarrolladas y las tasas de mortalidad en estos países son dieciocho (18) veces más altas que en países desarrollados (WHO, 2014). La infección persistente con HPV causa noventa por ciento (90%) de todos los cánceres anales, cerca del sesenta por ciento (60%) de ciertos tipos de cánceres orofaríngeos, y cuarenta por ciento (40%) de cánceres vaginal, vulvar y penil, en los Estados Unidos (ACS, 2015).

Considerando que las estadísticas oficiales que reporta GLOBOCAN corresponden al año 2012 (último dato oficial), la incidencia de cáncer cervical en Colombia proyectada para el año 2015 correspondía a 5,051 y para el año 2030 se estima en 7,251 nuevos casos al año en mujeres de todas las edades, frente a 710,249 nuevos casos en el mundo. En cuanto a las tasas de mortalidad, en Colombia para el año 2015 se proyectaba en 2,190 y para el año 2030 se estiman 3,470 muertes al año en mujeres de todas las edades, frente a 382,970 muertes por esta causa en el mundo (Globocan, 2012).

Loscalzo y colegas (Lozcalzo et al., 2011), destacan la importancia de reconsiderar y redefinir los determinantes de la enfermedad humana. En principio aclaran que toda enfermedad es compleja, y la definen como el resultado de la salida de una compleja red modular de nodos vinculados mecánicamente a pato-fenotipos subyacentes. Presentan un enfoque contemporáneo de la enfermedad, señalando que requiere ser vista desde la perspectiva de un sistema. El conocimiento de dos (2) categorías inter-relacionadas dentro de una célula u organismo, es esencial para el entendimiento de los determinantes en la expresión de una enfermedad, estas son las redes moleculares y las redes fenotípicas. Las primeras incluyen las redes de interacción a nivel de proteínas, redes metabólicas y redes reguladoras, que incluyen las redes de factores de transcripción y redes no-canónicas RNA. Las segundas, incluyen redes de co-expresión, en las cuales los genes están vinculados cuando se manifiestan patrones de expresión similares en diferentes enfermedades, y redes genéticas en las cuales los genes están y definen un fenotipo que se distingue de cualquier gen solo.

En el cuarto capítulo del libro anexo-2, numerales 4.5-4.7, se explican los antecedentes biológicos de la interacción que se presentan entre HPV, TLRs y citoquinas; HPV, TLRs y cáncer; y HPV, TLRs y vacunas, aspectos considerados en el modelo de vida artificial que se propone.

2.6. RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE ANTE HPV16

Las infecciones persistentes HPV16 pueden progresar a cáncer. La infección persistente se genera a partir de la interacción activa entre cierto tipo de células inmunes y el virus, lo cual permite la activación inicial de mecanismos de respuesta inmune innata, que posteriormente conduce a la activación de respuestas inmunes adaptativas, en procura de defender el

organismo del huésped. El virus ha evolucionado mecanismos que le permiten evadir el control del sistema inmune, evitando su detección y despeje.

El virus no se une directamente a las células, pero requiere contacto con la membrana basal que normalmente está acompañada por microabrasiones en la superficie cervical, la cual revela la membrana basal. Las células usan proteínas de membrana para transferir el virus al endosoma donde tiene lugar la liberación de la cápside, cerca de doce (12) horas posteriores al contacto en la superficie celular. Ciertas proteínas facilitan el escape del endosoma y su migración al núcleo, por medio de una red que se completa durante la mitosis. Luego se desorganiza el dominio nuclear y se presenta una acumulación de proteínas que participan en la regulación transcripcional, supresión de crecimiento y apoptosis, buscando controlar el ciclo celular (Deligeoroglou et al., 2013). Se sugiere que los mecanismos de evasión inmune del HPV actúan en las etapas tempranas de infección, como un mecanismo necesario para que la infección viral sea exitosa (Amador et al., 2013). HPV16 tiene capacidad para evadir el ataque del sistema inmune a través de varios mecanismos, entre los cuales se destacan los siguientes: (a) células inmunes en el torrente sanguíneo no pueden enfocar el virus fácilmente dado que no existe fase virémica, (b) HPV16 no provoca grandes daños a las células del huésped, es decir, no se produce lisis en células infectadas, por lo cual la inflamación se minimiza y por ende la posterior señalización, permitiendo de esta forma que el virus se duplique sin que el sistema inmune se entere, (c) la expresión de oncogenes virales es mantenida en bajos niveles durante la fase inicial del ciclo celular, y los productos altamente inmunogénicos solo son sintetizados en las capas superficiales del epitelio (Amador et al., 2013; Deligeoroglou et al., 2013).

La determinación de los mecanismos de replicación viral y la respuesta del huésped ante la detección de HPV16, hace posible el desarrollo de intervenciones preventivas y terapéuticas. Esta importante interacción es revisada con mayor detalle en el libro anexo-2, donde además de describir el virus HPV16, se explican los cambios que sufren las diferentes poblaciones celulares que intervienen en una respuesta inmune ante la detección de HPV16. También, se revisan aspectos relacionados con la inmunidad del huésped HPV, función, expresión y actividad de TLRs y citoquinas durante el proceso infeccioso, se explica el proceso que conlleva al desarrollo de cáncer cervical y se muestran algunas de las estrategias que utiliza el virus HPV16 para ser tan exitoso al evadir el control del sistema inmune.

2.7. VACUNAS HPV16

Previamente se mencionó que existen vacunas profilácticas y terapéuticas. Las primeras buscan prevenir el desarrollo de cáncer y las segundas buscan tratar lesiones cancerosas.

Varios tipos de cáncer son causados por virus. Las vacunas que ayudan a proteger contra infecciones con estos virus se cree que también pueden ayudar a prevenir algunos de estos tipos de cáncer. Algunas cepas del HPV han sido vinculadas a cánceres cervical, anal, de garganta, entre otros. Las vacunas tradicionales que se enfocan en los virus que pueden causar ciertos cánceres, ayudan a proteger contra algunos tipos de cáncer, pero no se enfocan directamente sobre células cancerosas (ACS, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2014), indica que como la mayoría del cáncer cervical ocurre veinte (20) años o más, luego de la infección por HPV, el periodo de

seguimiento actual hasta de 9.4 años, resulta ser muy corto para evaluar directamente la eficacia de las vacunas contra cáncer cervical. Considerando que los grados CIN2 y CIN3 tienen una alta probabilidad de progresar a cáncer cervical, éstas son lesiones precancerosas y por lo tanto miden de forma indirecta el resultado de cáncer cervical invasivo. Las niñas adolescentes por debajo de los quince (15) años de edad, objetivos principales de la vacunación profiláctica, no se incluyen en los estudios de eficacia, debido a la preocupación relacionada con las muestras cervicales en niñas y adolescentes y por la baja oportunidad de hallar lesiones. Actualmente, no se tiene establecida una correlación de protección inmune para vacunas HPV profilácticas, y no se sabe si altos niveles de anticuerpos resultarán en una protección de larga duración (WHO, 2014).

El sistema inmune es muy complejo y es claro que las células cancerosas tienen diferentes formas de eludirlo, haciendo que las vacunas no sean efectivas. Las vacunas para el tratamiento de cáncer son diferentes de las vacunas que trabajan contra los virus. Las vacunas para tratamiento tratan de hacer que el sistema inmune monte un ataque contra las células cancerosas en el cuerpo. Algunas vacunas para el tratamiento de cáncer son elaboradas a partir de células cancerosas, partes de células, o antígenos puros. Estas vacunas con frecuencia son combinadas con otras sustancias o células denominadas adyuvantes, las cuales ayudan a reforzar mucho más la respuesta inmune (ACS, 2015).

Algunas citoquinas son utilizadas en inmunoterapias de cáncer o como adyuvantes. En el primer caso, éstas no se enfocan específicamente en células cancerosas sino que buscan estimular el sistema inmune de una forma más general, no obstante en algunos casos puede conducir a una mejor respuesta inmune contra las células cancerosas. En el segundo caso, se utilizan junto con un tratamiento principal, normalmente una vacuna, para reforzar el sistema inmune. Las interleuquinas y los interferones, son algunos grupos de citoquinas que actúan como señales químicas entre las células. Interleuquina-2 (IL-2), por ejemplo, puede ser usada como medicamento para el tratamiento de algunos cánceres, o puede ser combinada con quimioterapia o con otras citoquinas, tal como sucede con interferón alpha (IFN- α). Estos tratamientos ayudan a ser más efectivos contra algunos cánceres, pero los efectos secundarios del tratamiento combinado también se incrementan. Los interferones ayudan al cuerpo a resistir las infecciones del virus y los cánceres. IFN- α refuerza la capacidad de ciertas células inmunes para atacar las células de cáncer, disminuir la velocidad de crecimiento de las células cancerosas y las venas sanguíneas que el tumor necesita para crecer. Algunas de las citoquinas que actualmente se estudian para ser utilizadas contra cáncer y/o como adyuvantes son IL-7, IL-12, IL-21 (ACS, 2015; Guo et al., 2015; Sim-GC et al., 2014; Torres-Poveda et al., 2014).

Existen otros medicamentos que no son encontrados de forma natural en el cuerpo pero pueden reforzar la respuesta del sistema inmune de forma no específica. Estos medicamentos se denominan inhibidores, buscan enfocar moléculas tales como PD-1, PD-L1 y CTLA-4, las cuales normalmente ayudan al sistema inmune a estar bajo control (Soares et al., 2015; Linch et al., 2016). Estas proteínas ayudan a impedir que el sistema inmune ataque las células normales. Este tipo de medicamentos ayuda a reforzar la respuesta del sistema inmune contra algunos cánceres. Existen también otras inmunoterapias y otros enfoques que actualmente se investigan para tratar el cáncer, en procura de obtener resultados más seguros y efectivos, tal es el caso de nuevos anticuerpos monoclonales, vacunas de células tumorales, vacunas antígeno, vacunas de células dendríticas, vacunas basadas en vectores, virus oncolíticos,

terapias de células-T, linfocitos infiltrantes de tumor e IL-2 (ACS, 2015; Schwartzentruber et al., 2011).

El desarrollo de medicamentos constituye otra de las áreas de la medicina que puede ser vista como un enfoque de sistemas, que no solo puede incluir el desarrollo del medicamento como tal, sino también la influencia comportamental sobre la tendencia a la enfermedad y otros aspectos como la genómica. Así lo señalan Loscalzo y colegas (Loscalzo et al., 2011), quienes consideran que el desarrollo convencional de los medicamentos, sin duda ha contribuido a limitar el número de medicamentos aprobados cada año, a pesar de los poderosos enfoques moleculares utilizados en su identificación. Los enfoques de sistemas basados en redes, han comenzado a corregir esta serie de limitaciones lo cual permite re-direccionar los esfuerzos de la industria.

En el libro anexo-2, numeral 4.7.9, se presenta el estado actual de las inmunoterapias dirigidas a la prevención, control y tratamientos de lesiones que se originan en infecciones causadas por HPV16.

2.8. RESUMEN DEL CAPÍTULO

El presente capítulo muestra, de una parte, la relación que existen entre sistemas complejos, sistemas biológicos, vida artificial, autómatas celulares y modelos basados en agentes; y de otra, la relación entre el sistema inmune biológico y artificial, frente al desarrollo de enfermedades que se originan por la infección con HPV16. Adicionalmente, se muestra el estado actual de la inmunoterapia dirigida al control de estas enfermedades.

Todo lo anterior, como aspectos que se tienen en cuenta al diseñar el modelo de vida artificial para el control de enfermedades causadas por el virus de papiloma humano tipo 16, el cual se presenta en detalle en el siguiente capítulo.

Se han elegido las metodologías referidas en el modelo de vida artificial que se propone, considerando que el surgimiento de patrones que emergen a partir del comportamiento dinámico que se modela, permite relacionar el modelo computacional con su referente del mundo real, y en este contexto, la naturaleza estocástica que proporcionan los ABMs, ayudan a recrear la robustez de la dinámica del comportamiento que se evidencia en los sistemas complejos, tal como el que se propone.

No solo se consideran las ventajas que aportan estas metodologías, también se tiene en cuenta que una de las limitaciones clave de los ABMs en el modelamiento biológico, es la que corresponde a la confiabilidad y calidad de los supuestos que se manejan en el diseño del modelo y en la implementación del prototipo. Es importante tener en cuenta que el conocimiento biológico que se tiene actualmente, tanto del ciclo de vida del HPV16 como del comportamiento del sistema inmune, no es totalmente conocido. Por esta razón y con el fin de mitigar estas falencias, se proporcionan en detalle todas las referencias de forma explícita, con base en las cuales se construye y se establecen las relaciones del prototipo frente a sus referentes biológicos. Es por ello, que adicionalmente al presente trabajo, se entregan dos (2) libros anexos referidos previamente, que corresponden a los antecedentes biológicos que son considerados por el modelo de vida artificial que se propone.

III DISEÑO DE UNA APLICACIÓN DE VIDA ARTIFICIAL

3 DISEÑO DE UNA APLICACIÓN DE VIDA ARTIFICIAL AL ESTUDIO DE VACUNAS PARA EL CONTROL DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 COMO AGENTE ETIOLÓGICO DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO

El ciclo viral vegetativo del HPV depende de la diferenciación epitelial, no puede ser fácilmente recapitulado *in-vitro*, y no existen modelos animales disponibles que ayuden a la investigación de la patogénesis del HPV *in-vivo*, lo cual constituye una de las barreras para el avance de la investigación en este campo. La ausencia de apropiados modelos experimentales impide un análisis fácil de la expresión de proteínas virales en diferentes estadios del ciclo de vida del HPV (Pang et al., 2013). Aspectos como estos, inspiraron el desarrollo del modelo de vida artificial que se presenta a continuación.

A partir de la caracterización del ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV16) y el correspondiente prototipo desarrollado por la autora de esta tesis (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013; Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010), junto con los dos (2) libros anexos a este documento, mediante los cuales se presentan los antecedentes biológicos, corresponde ahora presentar y explicar el modelo conceptual, diseño general y metodología utilizada, en el diseño y construcción del modelo de vida artificial que se propone.

El modelo de vida artificial propuesto, busca traducir la interacción que surge entre el ciclo de vida HPV16, la respuesta del sistema inmune innato y adaptativo ante su detección, así como también los efectos inducidos por la intervención de una vacuna terapéutica. Considerando que se trata de simular procesos biológicos complejos como éstos, se hace uso de herramientas de vida artificial que permiten crear analogías entre el mundo real y el mundo simulado.

El presente capítulo se organiza en seis (6) secciones. La primera sección, refiere las herramientas de vida artificial utilizadas en el desarrollo del presente trabajo. La segunda sección, presenta el modelo conceptual propuesto, concebido en tres (3) niveles que interactúan con el ciclo de vida del HPV16. La tercera sección, señala algunas consideraciones preliminares relacionadas con el sistema inmune y el ciclo de vida HPV. Las tres (3) secciones finales del presente capítulo, definen la activación de puntos de control, especificación de reglas y estados de transición, descripción del modelo lógico, incluida la explicación de la lógica utilizada en la predicción de la unión entre una molécula y un ligando, interacciones simétricas específicas, y un paso a paso del diseño del modelo propuesto.

3.1. DISEÑO GENERAL DEL MODELO

El modelo de vida artificial que se propone, plantea la interacción entre el ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16 y la respuesta del sistema inmune por parte del huésped, ante el proceso infeccioso persistente y ante su evolución hacia cáncer cervical, con el fin de habilitar microambientes a nivel celular y molecular, que permitan modelar comportamientos que surgen a partir de su interacción y de la posterior inclusión de vacunas terapéuticas que buscan intervenir alguna o varias vías de señalización implementadas, mostrando de esta forma una aproximación al resultado que se podría generar, con base en las funciones de cada componente que participa y de las interacciones que la ciencia ha demostrado y confirmado a través de sus publicaciones en la literatura científica.

Tal como lo plantea la biología y la ciencia médica, el sistema inmune es uno de los más complejos sistemas que el ser humano posee y que continuamente investiga, y la vida artificial computacional a través de sus técnicas entre las que se cuenta los sistemas complejos, modelos basados en agentes y autómatas celulares, hacen posible simular sistemas complejos del mundo físico para observarlos en un mundo virtual.

Las herramientas que ofrecen los sistemas complejos a nivel computacional se adaptan perfectamente a la realidad física, considerando que ambos son sistemas dinámicos que pueden tener una memoria, consideran redes de multiplicidad, relaciones lineales y no-lineales, y ciclos de retroalimentación, que en conjunto logran exhibir comportamientos emergentes.

3.1.1. Herramientas de vida artificial aplicadas al desarrollo del modelo propuesto

El sistema inmune es un sistema complejo que está compuesto de diversos grupos de células y moléculas que compromete una gran cantidad de tareas. Las células del mundo físico representan un complejo universo, con miles de reacciones bioquímicas que hacen parte de una red en que ellas se conectan y se regulan a partir de señales provocadas en el entorno, y en procura de predecir las acciones consecuentes en estas redes, se hace necesario identificar todos los componentes celulares y moleculares, comprender dónde se localizan, con quienes interactúa y cómo se regula su actividad. Para facilitar su comprensión, se hace uso de modelos dinámicos partiendo de la definición de las partes (libro anexo-1, capítulo I), y el entendimiento de los procesos biológicos que les rige (libro anexo-1, capítulos II-III), hasta completar el contexto del sistema completo (modelo conceptual propuesto). El entendimiento de los procesos biológicos y sus interacciones, son la materia prima para la construcción del modelo de vida artificial con base en el conocimiento aportado por los sistemas complejos y aplicaciones de vida artificial, revisadas en el capítulo II del presente documento.

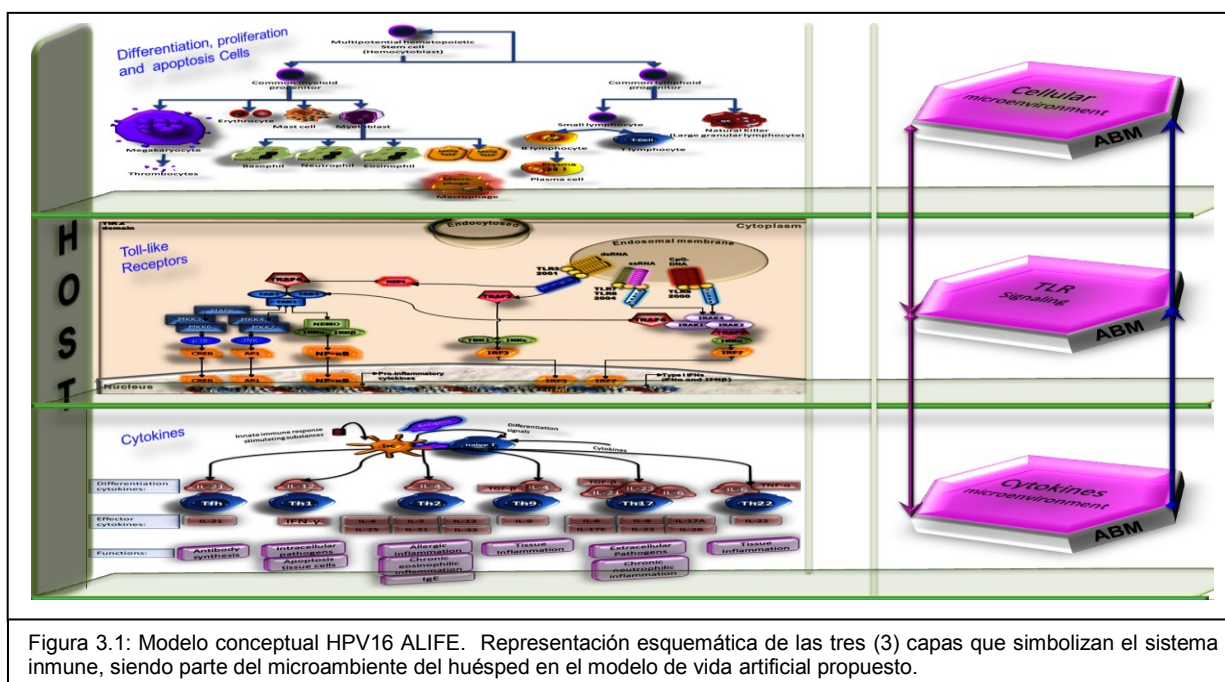
La vida artificial tiene que ver con la emergencia del orden en la naturaleza, y el modelamiento basado en agentes se relaciona con la exploración y el entendimiento de los procesos que conducen a la emergencia de patrones y comportamientos a través de medios computacionales. El modelamiento de agentes en el modelo propuesto, se construye con un enfoque de “abajo hacia arriba” mediante la representación explícita del comportamiento de agentes que representan componentes del sistema inmune humano y del HPV, así como los procesos por los cuales interactúan. En los sistemas biológicos, la emergencia es un evento

central, que surge a partir de las interacciones entre sus componentes. En general, los modelos basados en agentes con frecuencia exhiben patrones y relaciones que emergen a partir de las interacciones entre sus agentes.

Los agentes interactúan con un conjunto de agentes vecinos que se encuentren en el vecindario. El autómata celular, considerado una aplicación natural para modelar sistemas celulares (Alber et al., 2003; Ermentrout et al., 1993), representa el vecindario del agente; las células que rodean al agente, representan el vecindario del agente; y los agentes que residen en las células del vecindario, conforman los vecinos. Los agentes se mueven de acuerdo con las reglas dictadas por su comportamiento biológico (libro anexo-1, capítulos I-III), interactuando con otros agentes que están en su vecindario y pueden modificar su comportamiento. La representación de las vacunas en el modelo, hacen parte del entorno externo, en el que se establecen reglas para incorporar un grupo de agentes adicionales o modificar el comportamiento de los ya existentes, bloqueando o activando sus acciones.

3.1.2. Modelo conceptual en tres niveles

El modelo denominado “aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus de papiloma humano tipo 16”, se basa en un modelo conceptual que permite la interacción entre el HPV16, el sistema inmune del huésped y la acción externa de una vacuna que afecta el ciclo normal de interacción. El ciclo de vida del HPV16, corresponde al modelo diseñado bajo el concepto de autómatas celulares, cuyo detalle se presenta en el artículo (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013) y trabajo de tesis de maestría denominado “Modelo de crecimiento de las variantes del virus de papiloma humano tipo 16” (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010). La representación esquemática del modelo conceptual planteado puede ser observada en la [figura 3.1](#), y sus componentes e interacciones, de cara al modelo de vida artificial, son explicados a continuación.



El sistema inmune del huésped artificial, reaccionando ante el proceso infeccioso generado por HPV16, se define en un modelo basado en tres (3) niveles que interactúan entre sí, desarrollados conceptualmente bajo la dinámica de modelos basados en agentes (ABMs). El primer nivel, se encarga de controlar los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis celular de las diferentes poblaciones celulares que participan. El segundo nivel, corresponde al control ejercido por los receptores Toll-like (TLRs), cuyas vías de señalización se diseñan y controlan bajo el concepto de ABM. El tercer nivel, corresponde a la secreción de las citoquinas secretadas por las células y al control de las interacciones generadas por el microambiente que puedan modificar su comportamiento (ver [figura 3.1](#)). Estos tres (3) niveles se ven afectados por el ciclo de vida del HPV16 (su ciclo de vida se diseña y controla bajo el concepto de autómatas celulares), con lo cual se producen ciclos de retroalimentación positiva y negativa entre los diferentes niveles planteados (ver [figura 3.2](#)).

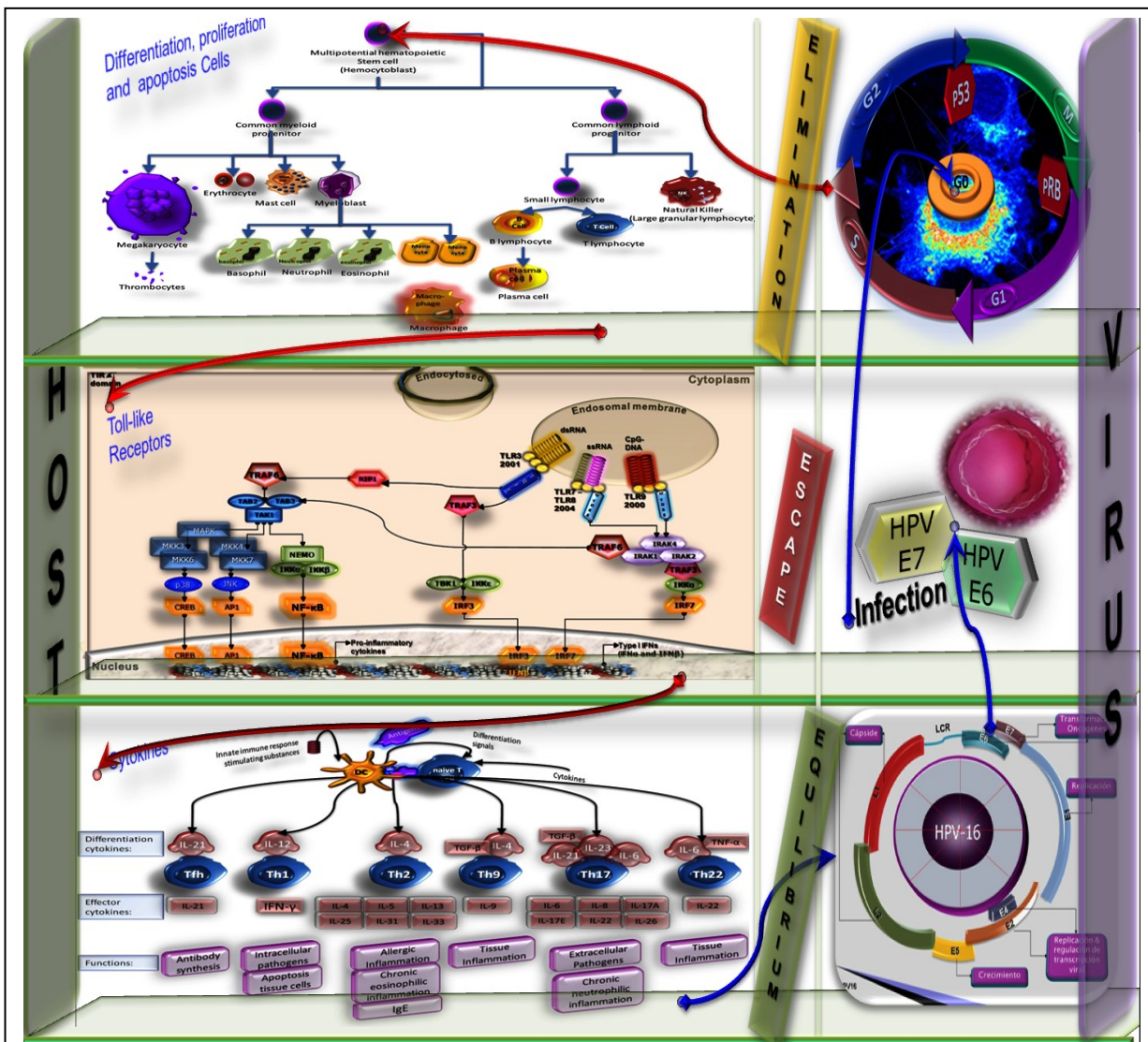
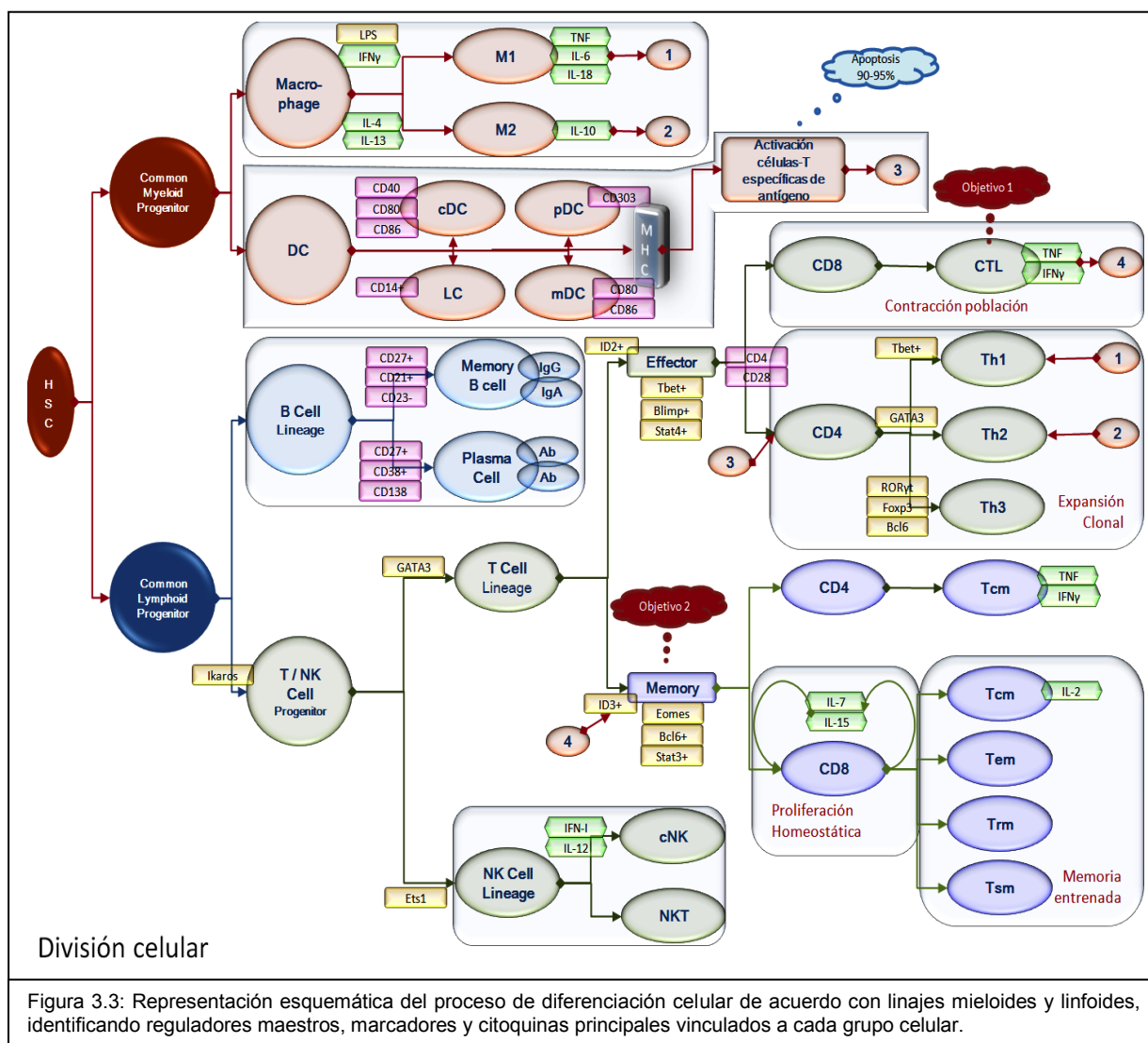


Figura 3.2: Diseño general del modelo HPV16 ALIFE. Representación esquemática de las tres capas que simbolizan el sistema inmune frente al microambiente del huésped y su interacción con el ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16, del modelo de vida artificial propuesto.

3.1.2.1. Primer nivel. Diferenciación, proliferación y apoptosis celular

El primer nivel del modelo de vida artificial propuesto, se concentra en los procesos de diferenciación celular de acuerdo con los linajes que se derivan de progenitores mieloides y linfoides. Por cada población celular que se deriva de cada linaje, se identifica el factor de transcripción – regulador maestro, regulador STAT, marcadores que se expresan en la superficie y citoquinas que secretan, y además controlando las citoquinas que generan polarización frente a otras poblaciones celulares. La [figura 3.3](#) muestra un resumen de la diferenciación de las diferentes poblaciones celulares representadas en el modelo de vida artificial propuesto. Información detallada de cada uno de los procesos biológicos relacionados con diferenciación, proliferación y apoptosis, vinculados a cada una de las poblaciones celulares que participan en el modelo, se encuentra reportada en el libro anexo-1, capítulo I (Antecedentes biológicos celulares).



La población de células-T representa una mayor complejidad, en particular por la plasticidad asociada con células-T CD4+. No obstante, los subgrupos de poblaciones celulares que se derivan, se caracterizan por poseer perfiles únicos que pueden ser diferenciados a nivel de citoquinas. La [figura 3.4](#), muestra el proceso de diferenciación de células-T CD4+ y la plasticidad que se presenta con los diferentes poblaciones celulares relacionadas, las cuales hacen parte del modelo de vida artificial propuesto.

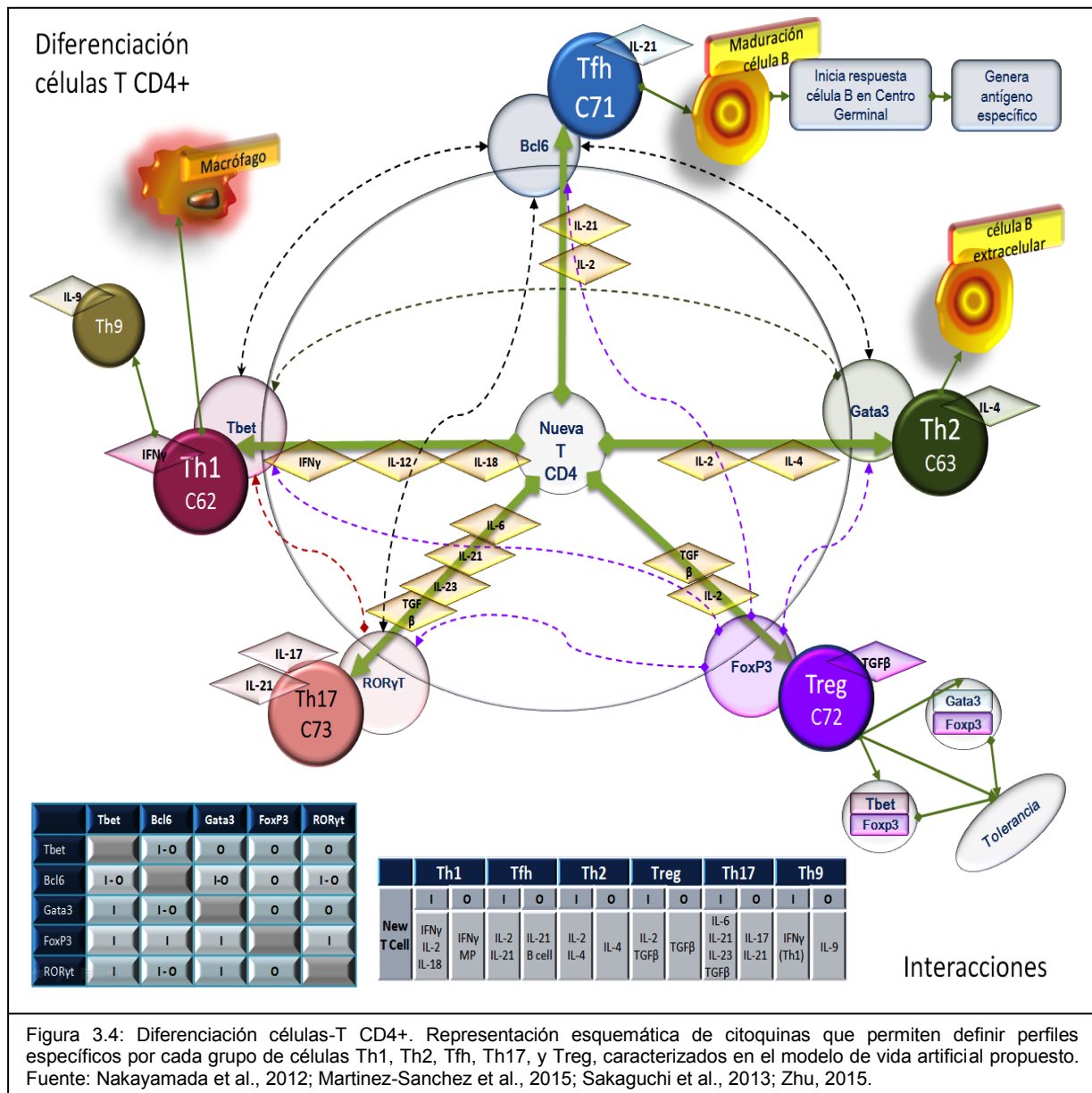


Figura 3.4: Diferenciación células-T CD4+. Representación esquemática de citoquinas que permiten definir perfiles específicos por cada grupo de células Th1, Th2, Tfh, Th17, y Treg, caracterizados en el modelo de vida artificial propuesto. Fuente: Nakayamada et al., 2012; Martínez-Sánchez et al., 2015; Sakaguchi et al., 2013; Zhu, 2015.

Con relación a las diferentes poblaciones celulares, diferenciadas a partir de células-T CD4+, se plantea una fuerte interacción entre poblaciones celulares, citoquinas y marcadores de superficie, que serán la base de interacción con los niveles posteriores.

3.1.2.1.1. Población inicial

Con base en los protocolos para el procesamiento de sangre humana, se estiman frecuencias y porcentajes por cada tipo de población celular (Stemcell Tech, 2015). A partir de la población de células referidas, las poblaciones iniciales se estiman considerando las frecuencias y porcentajes, definidos por expertos en células (STEMCELL TECHNOLOGIES, www.stemcell.com, consultado el 4 de octubre de 2015), y mostrados en la [Tabla 3.1](#).

Tipo Célula	Frecuencias (X 10⁶ células/mL)	Porcentaje	Fuente
Eritrocitos	3800 - 6200	93 – 96% células sanguíneas	PMBC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
Plaquetas	140 - 450	4 – 7% células sanguíneas	
Leucocitos	4.1 – 10.9	0.1 – 0.2 % células sanguíneas	WB (Whole Blood)
Linfocitos	1.1 – 3.5	15 – 47% de leucocitos	WB (CD3/CD19)
Células-T	0.54 – 1.79	7 – 24% de leucocitos	WB (CD3+), PMBC (CD3+)
Células-T CD4+	0.30 – 1.50	4 – 20% de leucocitos	WB (CD4+), PMBC (CD4+)
Nuevas células-T CD4+	0.08 – 0.76	1 – 10% de leucocitos	PMBC
Células-T CD4+ Memoria	0.25 – 0.81	3 – 11% de leucocitos	PMBC
Células-T reguladoras CD4+CD25+	0.007 – 0.052	0.1 – 0.7% de leucocitos	WB (CD4+CD25+), PMBC (CD4+CD25+)
Células-T CD8+	0.14 – 0.82	2 – 11% de leucocitos	WB (CD8), PMBC (CD8)
Nuevas células-T CD8+	0.03 – 0.21	0.4 – 2.6% de leucocitos	PMBC
Células-T CD8+ Memoria	-	1 – 7% de leucocitos	PMBC
Células-B	0.07 – 0.53	1 – 7% de leucocitos	WB (CD19/CD20),
Nuevas Células-B	0.05 – 0.37	0.7 – 4.9% de leucocitos	PMBC
Células-B Memoria	-	0.2 – 1.7% de leucocitos	PMBC
Células Plasma	-	0.2 – 2.0% de leucocitos en medulla ósea	WB (CD138), PMBC (CD138)
Células NK	0.08 – 0.43	1 – 6% de leucocitos	WB (CD56), PMBC (CD56)
Células NKT	0.08 – 0.43	1 – 6% de leucocitos	WB (CD2), PMBC (CD2)
Células Mieloides	3.9 – 6.5	53 – 86% de leucocitos	WB (CD33), PMBC (CD33)
Células Dendríticas	0.02 – 0.06	0.3 – 0.9% de leucocitos	PMBC
Células Dendríticas Plasmacitoides	0.01 – 0.04	0.2 – 0.6% de leucocitos	PMBC

Tabla 3.1: Porcentajes de participación por tipo de célula en flujo sanguíneo			
Tipo Célula	Frecuencias (X 10^6 células/mL)	Porcentaje	Fuente
Monocitos	0.20 – 0.90	2 – 12% de leucocitos	WB, PBMC (CD14)
Granulocitos	2.13 – 6.35	35 – 80% de leucocitos	WB (CD66b)
Neutrófilos	2.09 – 5.97	30 – 80% de leucocitos	PBMC
Eosinófilos	0.03 – 0.30	0 – 7% de leucocitos	PBMC
Basófilos	0.01 – 0.08	0 – 2% de leucocitos	PBMC
Células Hematopoyéticas y Células Progenitoras	0.001 – 0.007	0.03 – 0.09% de leucocitos	WB (CD34+)

Es importante aclarar respecto a la población inicial de células-B, que ésta se asume inicialmente en el modelo de vida artificial bajo el contexto de un microambiente de desarrollo en médula ósea, básicamente porque el desarrollo de células-B en la médula ósea es continuo a través de la vida, y porque sus progenitores encuentran nichos en los cuales ellas pueden residir durante la vida útil del organismo. En contraste, la linfopoyesis-B en hígado fetal es temporal, y no existen nichos que proporcionen residencia de larga vida. En efecto, la médula ósea parece proporcionar nichos en los cuales no solamente los progenitores, sino también linfocitos-T de memoria y células plasma de larga vida, pueden sobrevivir a extensos periodos de tiempo sin proliferación celular o muerte celular. La médula ósea retiene la capacidad para repoblar el huésped. La médula ósea también genera células-B que pueden ser encontradas en la zona marginal del bazo, como células-B de zona marginal (MZB) (Melchers, 2015). El modelo de vida artificial propuesto, asume un proceso de diferenciación asimétrica, de acuerdo con la respuesta del microambiente ante el comportamiento de señales producidas por citoquinas.

Para estimar las poblaciones celulares iniciales en el modelo de vida artificial propuesto (en adelante **HPV16-ALIFE**), se toma como base la población de Leucocitos en la sangre. El modelo HPV16-ALIFE asume que una célula artificial corresponderá a una población real en el cuerpo humano de 1×10^6 mL. El modelo presenta la opción de modificar la población inicial acumulada entre las poblaciones promedio de células-T, células-B y células dendríticas, considerando los límites inferiores y superiores establecidos por (Stemcell Tech, 2015), como porcentajes de la población de leucocitos, estimada entre 4.1 y 10.9×10^6 mL. A partir de este valor, el modelo distribuye de forma aleatoria la población inicial de los linajes de células-B, células-T y células dendríticas, teniendo en cuenta la localización de las mismas en sus respectivas áreas de proliferación [Tabla 3.1](#).

En el mundo real, el tamaño de los linfocitos humanos ha sido determinado por planimetría heterogénea, medios ópticos electrónicos o analizadores de partículas, en un pequeño grupo de controles normales y pacientes con leucemia linfocítica crónica. El tamaño en pacientes normales varía entre cinco (5) y once (11) micrones, y en pacientes con leucemia entre cuatro y medio (4.5) y diez (10) micrones (Bionumbers, 2015). Otros laboratorios, reportan el tamaño de los linfocitos entre siete (7) y diez (10) micrones (AACC, 2015). A partir de estos datos se define la representación del aspecto de las células, considerando además el estándar del

lenguaje de programación utilizado “NetLogo” (Wilensky, 1999) (en adelante NL), para el desarrollo del prototipo. Por conveniencia, el tamaño de cada tipo de célula, corresponderá al valor promedio entre los límites superior e inferior, dividido diez (10). En la población celular inicial del prototipo, se asume que las células se encuentran en un estado inmaduro e inactivo. Una vez la célula se active, aumentará su tamaño en una centésima (0.01) parte respecto a su tamaño original.

El lenguaje NL define “Patch” como un bloque (en 3D o 2D) del mundo simulado que se identifica por sus coordenadas (x, y, z) o (x, y), según sea el caso. Un conjunto de “patches” hacen el mundo. Un agente móvil se conoce como “turtle”, el cual puede moverse de un “patch” a otro, de acuerdo con las reglas de movimiento que se definan, identificando a cada uno, por un número y no por sus coordenadas. Se pueden tener diferentes tipos de “turtles” con variables relacionadas. Adicionalmente, se pueden crear conexiones “link” que pueden ser creadas entre agentes, las cuales se identifican por el número de los agentes que interactúan, y también pueden contener variables y diferentes clases de vínculos.

Previamente, se han revisado las interacciones entre las diferentes poblaciones celulares (ver libro anexo-1, capítulo I (Antecedentes biológicos celulares), capítulo II (Antecedentes biológicos de receptores TLRs), y capítulo III (Antecedentes biológicos de Citoquinas). Adicionalmente, se revisa la interacción entre el ciclo de vida HPV16 y su relación con las poblaciones celulares, TLRs, Citoquinas y desarrollo de vacunas, en el libro anexo-2, las cuales se resumen de forma general en la [figura 3.5](#).

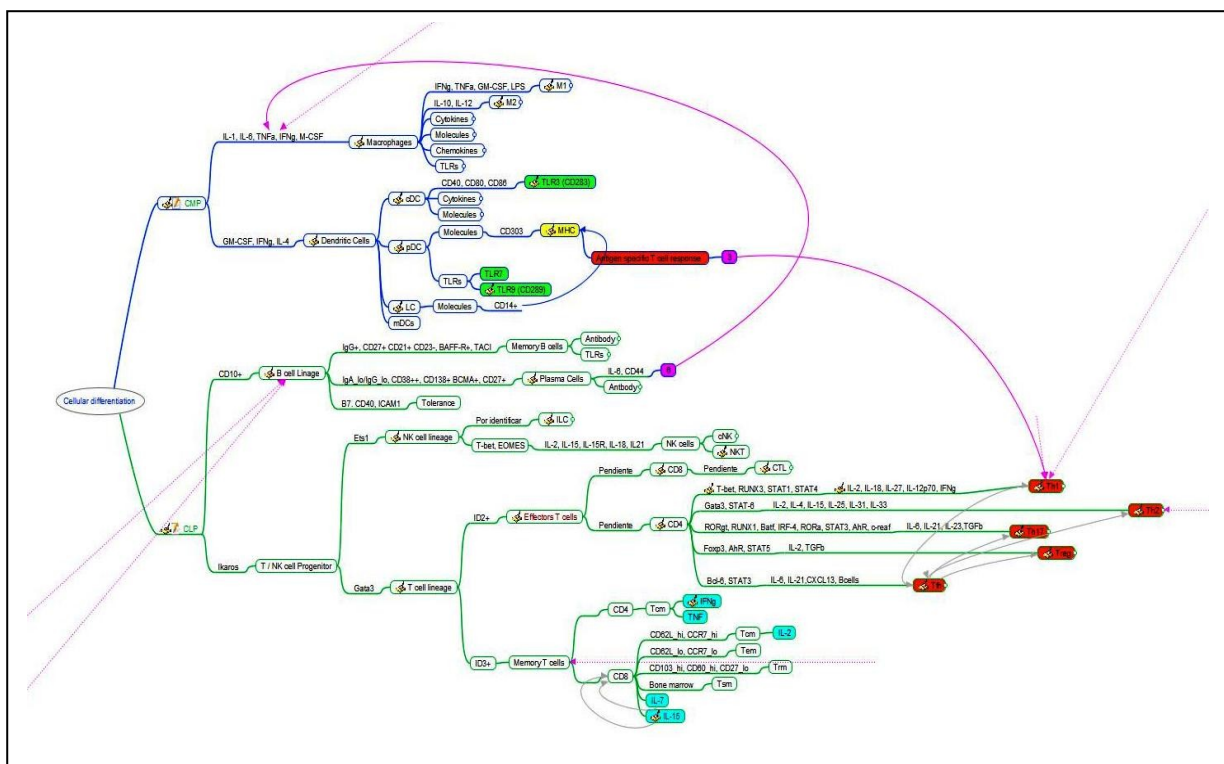


Figura 3.5: Mapa conceptual interacción celular general. Versión comprimida de los tipos de células que corresponden a poblaciones que participan en el modelo de vida artificial, considerando la expresión de citoquinas, moléculas y TLRs, relacionados.

Interacciones particulares serán activadas de acuerdo con el desarrollo de procesos involucrados. Por cada población celular que participa en inmunidad innata y adaptativa, se verifica su interacción con citoquinas, expresión de moléculas, receptores TLRs y algunas quimioquinas relevantes. La [figura 3.6](#), plantea el mapa conceptual de las interacciones básicas, es decir, que parten de la expresión celular sin que intervengan los vecinos ni el microambiente que pueda resultar de sus interacciones.

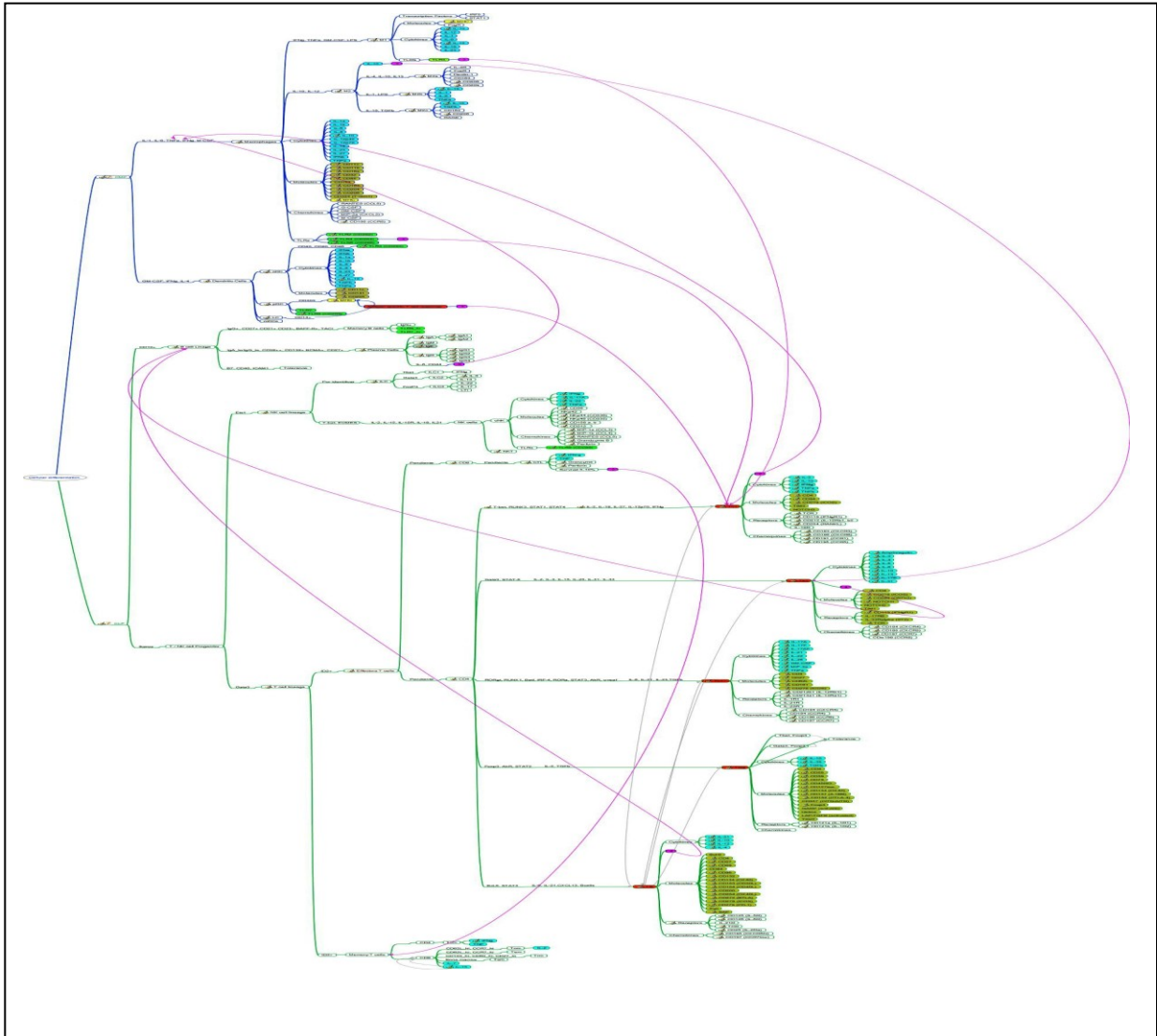
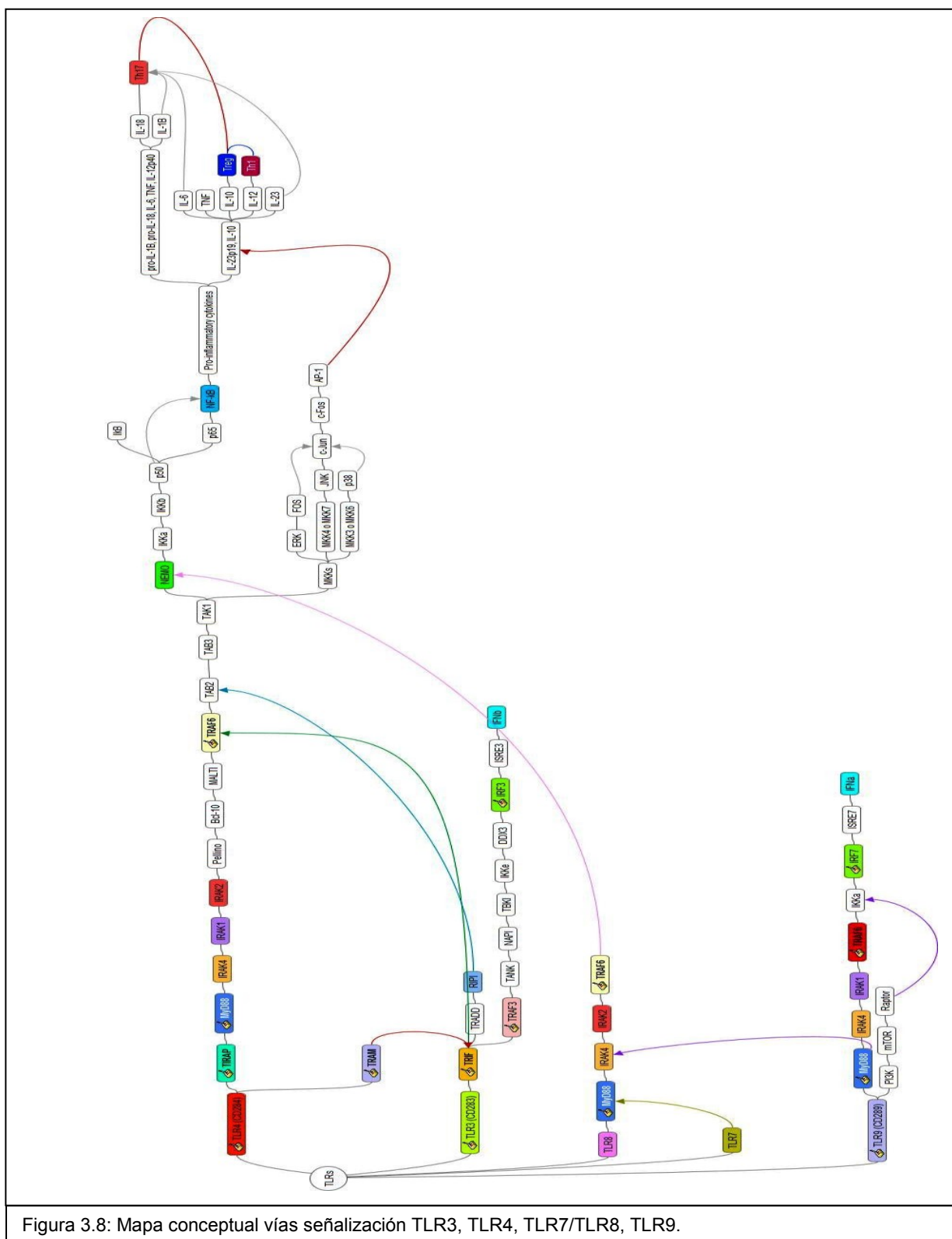


Figura 3.6: Mapa conceptual interacciones celulares detalladas. Versión detallada de la diferenciación celular y expresión de citoquinas, moléculas y TLRs, vinculadas a cada una de las poblaciones celulares del modelo de vida artificial que se plantea.

En resumen, el primer nivel incorpora las poblaciones de macrófagos, células dendríticas, células B, células-T, células plasma (de corta y larga vida), células-B de memoria (de corta y larga vida), células NK (*natural Killer*), células-T de memoria, CTLs (*cytotoxic T lymphocytes*), células-T ayudadoras Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, células Treg (*T regulatory*). Adicionalmente, se incorpora población de células dendríticas foliculares, queratinocitos y anticuerpos.



Los mapas conceptuales de interacciones y vías de señalización, se desarrollaron con la herramienta “FreeMind”, versión 0.9.0. (Mueller, 2015). Las imágenes incorporadas en las [figuras 3.5, 3.6 y 3.8](#), corresponden a imágenes generadas a partir de este software, razón por la cual la calidad de resolución es menor a las demás figuras del documento. No obstante, la construcción de los mapas se entrega con el documento y en ellos se pueden revisar los detalles con mayor precisión directamente con la herramienta de software referida.

3.1.2.3. Tercer Nivel. Secreción e interacción de citoquinas

El modelo de vida artificial propuesto incorpora las cinco (5) familias de citoquinas documentadas en el libro anexo-1, capítulo III, es decir, TNF (*tumor necrosis factor*), TGF (*tumor growth factor*), IFNs (*interferons*), MIF (*macrophages migration inhibitory factor*), e ILs (*interleukins*), de acuerdo con las funciones y perfil de interacciones biológicas revisados en publicaciones científicas hasta el momento. Adicionalmente, se consideran interacciones con el ciclo de vida HPV16, detalladas en el libro anexo-2, capítulo IV, numeral 4.3. La [figura 3.9](#) muestra el grupo de citoquinas incorporadas al modelo HPV16-ALIFE.

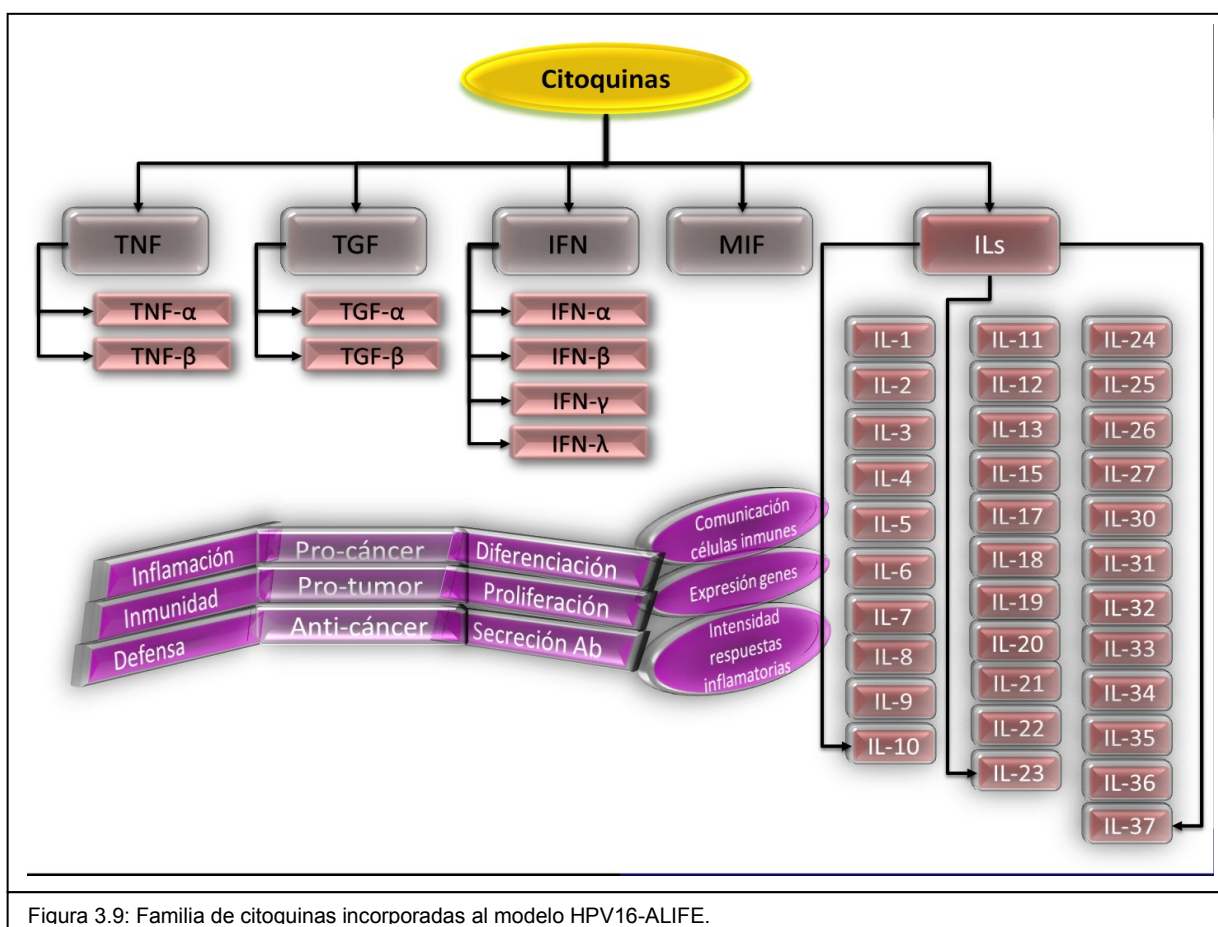


Figura 3.9: Familia de citoquinas incorporadas al modelo HPV16-ALIFE.

3.1.3. Consideraciones preliminares

A continuación, se presenta de forma muy general la interacción que se genera entre el ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16 durante el desarrollo de su proceso infeccioso y ambas respuestas del sistema inmune por parte del huésped (innata y adaptativa), lo cual se muestra en la [figura 3.10](#) y se explica luego, en aras de brindar mayor comprensión sobre el modelo conceptual propuesto e implementado en el prototipo de vida artificial. Información general de esta interacción se encuentra desarrollada en el capítulo II, numerales 2.5 y 2.6, del presente documento, y en forma más detallada en el libro anexo-2.

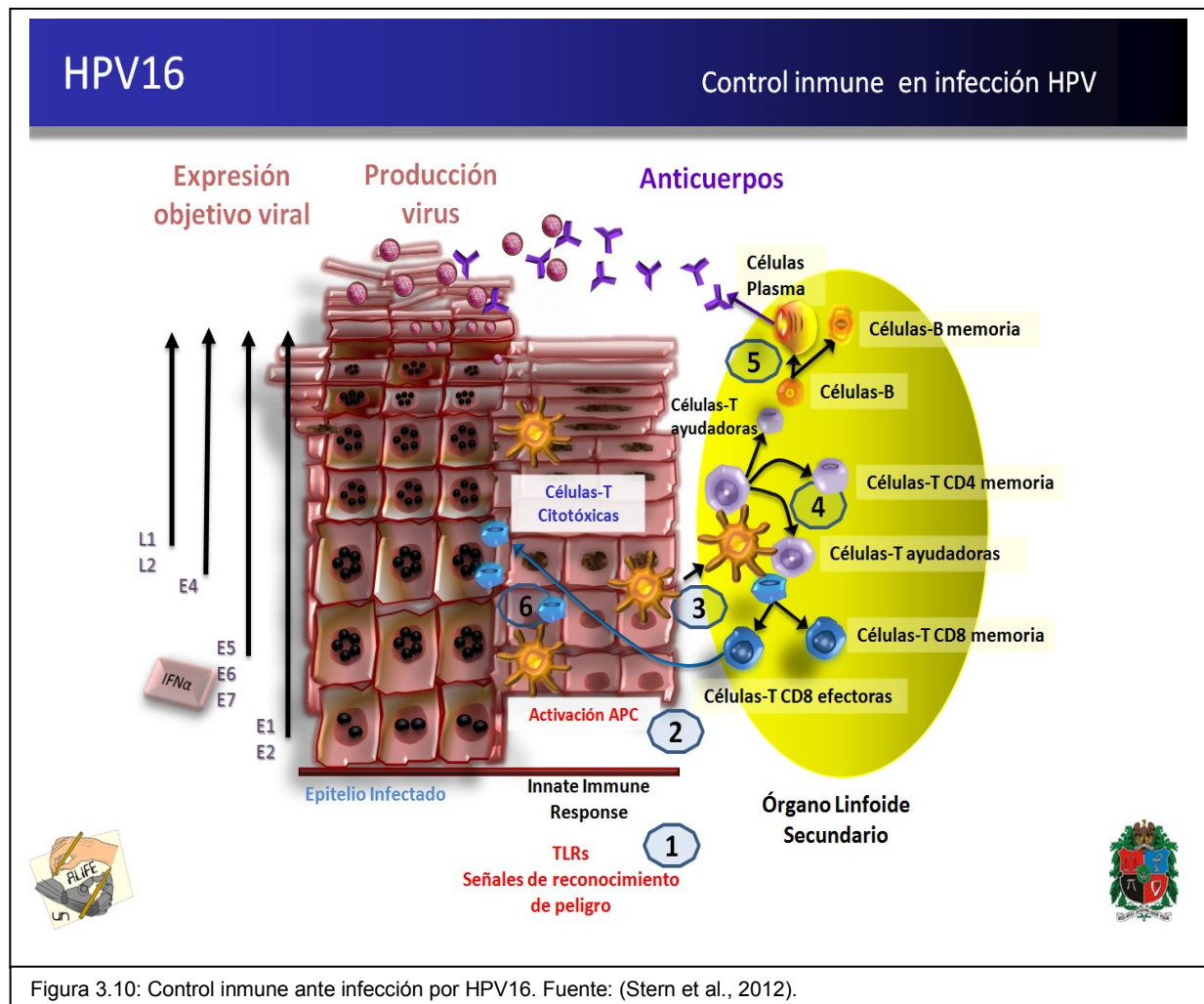


Figura 3.10: Control inmune ante infección por HPV16. Fuente: (Stern et al., 2012).

3.1.3.1. Respuesta inmune ante infección por HPV16

La activación de la respuesta del sistema inmune en general, requiere de tres (3) señales. Una primera señal se presenta durante el proceso de maduración de las células dendríticas (DCs). La segunda señal se presenta durante el proceso de interacción entre células-T y células-B. La tercera señal se produce a partir de la generación de citoquinas. Los casos de regresión en

procesos infecciosos HPV, están asociados y son dependientes de una respuesta Th1 dominada por células-T CD4+, y de la generación de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra epítopes conformacionales sobre la proteína L1, desplegada sobre la cápside del virus. Los casos de infección persistente y de alto riesgo, denotan un fracaso en el desarrollo de una efectiva inmunidad mediada por células. Esta situación se asocia a un exitoso mecanismo de evasión inmune innato del HPV16, que evita la detección del virus por parte del sistema inmune del huésped, haciendo que no se liberen o se liberen pocas citoquinas pro-inflamatorias importantes para la activación de células dendríticas, inhibiendo de esta forma la respuesta innata y provocando que las proteínas E6 y E7 de HPV16 interactúen directamente con componentes de señalización, tales como Interferón, desregulación de TLR9 por la proteína E7, y desregulación del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) por E5, eventos que hacen que se retarde la activación de la respuesta inmune adaptativa y se facilite de esta manera la infección persistente (Stanley, 2006; Stanley, 2010; Stern et al., 2012).

3.1.3.2. Descripción procedimiento de diferenciación celular ante la detección de una infección simple

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son identificados por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), entre los que se encuentran los TLRs del sistema inmune innato, los cuales permiten la activación de efectores inmunes innatos y la inducción de una respuesta inmune adaptativa apropiada. Las células presentadoras de antígeno (APCs), expresan receptores y secretan citoquinas locales que señalan si las células-T toman la vía reguladora Th1 o Th2. Estas funciones son activadas por interacción receptor-ligando entre APC y patógeno, y además por citoquinas liberadas por APCs y otras células del vecindario. Las APCs y citoquinas liberadas, son el puente entre inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Las células-T reconocen antígenos que han sido procesados entre péptidos cortos, unidos a proteínas de MHC y son presentados como un complejo receptor unido a la membrana sobre la superficie celular. Las células-T CD4+ reconocen los antígenos presentados por MHC clase II, y las células-T CD8+ reconocen los antígenos presentados por MHC clase I. La activación de las células-T CD4+, resulta en la secreción de una variedad de pequeñas proteínas o citoquinas, que ayudan a regular otras poblaciones celulares ayudadoras, destacándose las poblaciones Th1, Th2 y Treg. Células Th2, secretan las interleuquinas IL-4 e IL-10 (y otras), que ayudan al proceso de diferenciación de linfocitos-B cebados por antígenos entre células plasma, haciendo estas últimas disponibles para la secreción de anticuerpos. Células Th1 secretan IFN- γ , creando un medio en el cual los efectores citotóxicos claves, tales como macrófagos, células NK, y linfocitos-T CD8+, son activados, generando de esta forma inmunidad mediada por células. Células Treg, expresan el factor de transcripción Foxp3 y usualmente secretan IL-10 y TGF- β . Cada célula-B madura, lleva un único receptor BCR unido a la membrana, una inmunoglobulina o molécula anticuerpo que es específica para un motivo o epítipo discreto sobre un antígeno. Una vez que la nueva célula-B encuentra antígeno y es activada, lleva a cabo un programa de proliferación y diferenciación, mediante el cual son generadas células-B de memoria y células plasma efectoras. Las células plasma secretan grandes cantidades de anticuerpos, los cuales son solubles, pero de lo contrario versiones idénticas de la membrana se unen al receptor de células-B. En el primer encuentro con antígeno, se genera una primera respuesta de anticuerpo; más tarde, un re-encuentro con el mismo antígeno causa una respuesta secundaria más rápida, produciendo altos niveles de anticuerpos con una alta afinidad de unión para el antígeno objetivo. Los antígenos unidos al receptor de células-B, ceban las

células-B que requieren luego de la ayuda consciente de las células Th2 en la forma de interacción receptor-ligando y citoquinas que van surgiendo a través del programa de diferenciación. La ayuda de las células-T es fundamental para cambiar de estado, generando diferentes clases de anticuerpos e isotipos, y desarrollando células-B de memoria específica de antígeno (Stanley, 2006; Stanley, 2010).

Con relación a los procesos de división y muerte, los linfocitos T y B, típicamente toman entre treinta (30) y cincuenta (50) horas en entrar a la primera división y luego se toman cerca de nueve (9) horas en pasar a través de cada ronda de división posterior. La variabilidad en los tiempos para dividirse y morir puede ser una propiedad esencial de linfocitos que permiten regulación cuantitativa según la fortaleza de la respuesta inmune, no obstante, la progresión a través del número de divisiones puede ser regulada (Hawkins et al., 2007).

3.1.3.3. Descripción procedimiento general ante la detección de una infección viral

Nuevas células-B en reposo estimuladas por motivos CpG tienen una división estrictamente regulada y se cree que se dividen exitosamente un máximo de seis (6) veces. En células-T, en respuesta a la infección, se indica que se puede inducir una división asimétrica que conduce a la generación de células hijas con diferente fuente de proliferación (Chang et al., 2007, Hawkins et al., 2007). Se han revelado variaciones de tiempos de división significativas en un rango que varía entre las seis (6) y veinticinco (25) horas, destacando que las variaciones de tiempo observadas han sido independientes del número de divisiones. Se ha mostrado también, que el tiempo medio para dividir ha sido aproximadamente de dieciocho (18) horas y que este tiempo disminuye progresivamente con las divisiones exitosas. Al comparar los tiempos de división con los tiempos de muerte, se ha sugerido que las células pierden su capacidad para someterse a división. Se ha observado además que las células estimuladas por antígeno toman un promedio de treinta y cinco (35) horas para dividirse la primera vez y luego van aumentando a través de ciclos de crecimiento y división celular, hasta por cinco (5) veces, en un tiempo promedio de nueve (9) horas. Se cree además, que las últimas rondas de división toman más tiempo para hacerlo en comparación con las divisiones iniciales. Hawkins y colegas, reportan un modelo mínimo para describir características de crecimiento y muerte de linfocitos, en el que incluyen tres (3) controles mecánicos que interactúan, gobernando el destino de cada célula. Un primer mecanismo, que regula la decisión de entrar a la fase de crecimiento que conduce luego a la división celular; un segundo mecanismo, que regula el tiempo para dividir si ya se ha iniciado el proceso; y un tercer mecanismo, que regula el tiempo para morir, si el crecimiento no es iniciado. Indican además, que todos los tres (3) controles han mostrado evidencia de que su operación puede ser alterada a través de cada división de células y que cada control mecánico ha mostrado un extraordinario grado de variación, con lo cual se asegura que la experiencia en cada célula es única (Hawkins et al., 2009).

Interacción entre células-B y células-T. La mayoría de la activación de células-B es iniciada por antígenos sobre la superficie de células presentadoras, incluyendo células dendríticas (DCs), células dendríticas foliculares (FDCs) y macrófagos. La unión del antígeno afín al receptor BCR inicia la señalización intracelular. BCR se dirige a captar antígenos objetivos para el compartimento intracelular endosomal que contiene complejo de histocompatibilidad

mayor (MHC), el cual le permite su presentación ante células-T afines para promover la máxima activación de células-B (Thaunat et al., 2012).

Presentación de antígenos. Durante una típica respuesta inmune humoral, las células-B presentan antígenos ante células-T en dos (2) distintas situaciones dentro de tejidos linfoides secundarios: en la frontera de células B-T, después de la adquisición inicial del antígeno; y dentro del centro germinal (GC), para generar afinidad de anticuerpos. Las células-B mantienen una distribución polarizada de antígenos aún después de la división de células-B, y se mantiene tanto en tiempo como durante la división, por lo cual parece que la segregación asimétrica de antígenos puede ser intrínseca a las células-B que se dividen, dado que la segregación asimétrica de antígenos ocurre sobre la división de células-B. Los niveles diferenciales de antígeno generados por segregación asimétrica influyen en la capacidad de las células-B para inducir respuestas en células-T afines, y se cree que la segregación asimétrica de antígenos no depende del contacto prolongado con APCs ni de la formación asociada a la sinapsis inmunológica, en cambio parece ser intrínseca a las células-B que se dividen (Thaunat et al., 2012).

El proceso de diferenciación de células-B, clave en la respuesta inmune, involucra procesos complejos, tales como hipermutación somática, recombinación de cambio de clase y maduración de afinidad, los cuales son detallados en el libro anexo-1, capítulo I, numeral 1.2.2, y se resumen a continuación.

Diferenciación de células-B. Las células-B que reciben altas cantidades de antígeno pueden permitir una competencia más efectiva para limitadas células-T ayudadoras, tanto en la frontera de células B-T como en el centro germinal (GC), facilitando de esta forma la generación de hipermutación somática y cambio de clase. El desigual particionamiento de antígenos polarizados después de la división, genera distintas poblaciones de células-B que rápidamente retienen o eliminan antígenos, y ambos procesos pueden ser fundamentales para una efectiva inducción de respuestas inmunes humorales y para la producción de anticuerpos de alta afinidad. En este proceso, también la división asimétrica celular permite que se generen células-B con antígeno-negativo, con una capacidad disminuida para presentar antígeno. La sobrevivencia de estas células depende de la acumulación adicional de antígeno, lo que permite la corrección de pruebas de BCR mutado nuevamente y la retención de células-B con BCR de alta afinidad, lo cual permite producir una selección adicional durante la maduración de afinidad (Thaunat et al., 2012).

Hipermutación somática (SHM). Un proceso en el cual puntos de mutación son generados en las regiones variables de genes inmunoglobulinas, creando de esta forma un repertorio más específico cuando se combina con selección. Algunas mutaciones pueden incrementar la afinidad del receptor de células-B (BCR) para el antígeno específico, pero otros pueden conducir a una pérdida de reconocimiento antígeno por BCR o por la generación de un receptor auto-reactivo (Kurosaki et al., 2015). Este proceso resulta en un cambio en la proteína expresada, lo cual puede alterar la afinidad o especificidad para el antígeno (De Silva et al., 2015).

Cambio de clase o cambio de isotipo. Un cambio de recombinación en el DNA que codifica la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, de IgM a cualquiera de los IgG, IgA o IgE. La recombinación ocurre en secuencias DNA repetitivas (regiones de cambio), que están localizadas corriente arriba de cada región constante del gen (Kurosaki et al., 2015).

Maduración de afinidad. Corresponde a la variante del proceso de hipermutación somática, por la cual las células-B son seleccionadas para sobrevivir y proliferar sobre la base de su incrementada afinidad hacia el antígeno (De Silva et al., 2015).

3.1.3.4. Descripción procedimiento específico ante la detección de infección por HPV16

De una forma muy resumida, se relacionan los pasos que se siguen en este proceso. Información ampliada y con mayor detalle es suministrada en el libro anexo-2, capítulos III y IV.

En primer lugar, los TLRs reconocen señales de peligro, y a partir de este evento se genera la activación de células presentadoras de antígenos, activación de efectores no-específicos inmediatos, y secreción de interferones. Las citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas, soportan la activación óptima de células de Langerhans presentando antígenos locales, procesando antígeno viral objetivo e iniciando la migración hacia ganglios linfáticos. Se presenta la activación óptima de inmunidad adaptativa y la generación de inmunidad de células-T CD4+, específicas Th1, soportando el desarrollo de células-T efectoras y células-T CD8 citotóxicas y de memoria contra proteínas E2, E6 y E7 de HPV16. La inmunidad mediada por células se cree es fundamental en el despeje del virus en células epiteliales basales. Las células-T ayudadoras soportan la activación óptima de células-B secretando anticuerpos neutralizantes específicos de HPV16. Células plasma de larga vida proporcionando altos niveles de anticuerpos pueden proteger contra una posterior infección a través de la transudación (paso a través de una membrana) entre las secreciones mucosales o una a través de exudación en suero. Múltiples HLA (*human leukocyte antigen*) restringen CTLs (*cytotoxic T lymphocyte*) específicos, para detener tráfico de antígenos virales tempranos, debido a la lesión y células objetivo infectadas por el virus, las cuales pueden proporcionar control inmune y despeje viral (Amador-Molina et al., 2013; Bhat et al., 2011; Conesa-Zamora, 2013; Deligeoroglou et al., 2013; Song et al., 2015; Tying, 2000).

3.1.3.5. Cáncer e Inmunidad

El sistema inmune juega un rol clave en la defensa del organismo contra el cáncer. El concepto actual de cáncer involucra tres (3) fases esenciales de interacción entre el huésped y las células tumorales, denominadas eliminación, equilibrio y escape. La eliminación, se refiere al reconocimiento de un tumor creciendo, debido a que las células de cáncer expresan sus propios antígenos, hacen que las células inmunes los reconozcan, y genere una posterior infiltración de células efectoras inmunes tales como células NK, las cuales producen múltiples citoquinas. La fase de equilibrio, se refiere a las células que han sobrevivido a la eliminación, donde los linfocitos ejercen una presión de selección sobre células tumorales, las cuales son genéticamente inestables y mutan rápidamente, resultando en la selección inmune de células tumorales con disminuida inmunogenicidad, lo cual les permite sobrevivir ante un huésped inmuno-competente. En la fase de escape, las células tumorales que han adquirido resistencia ante el sistema inmune, continúan creciendo y se expanden de forma descontrolada, evento que puede conducir a desarrollo de cáncer (Kim et al., 2007; Yuzhalin et al., 2014).

3.1.4. Activación puntos de control

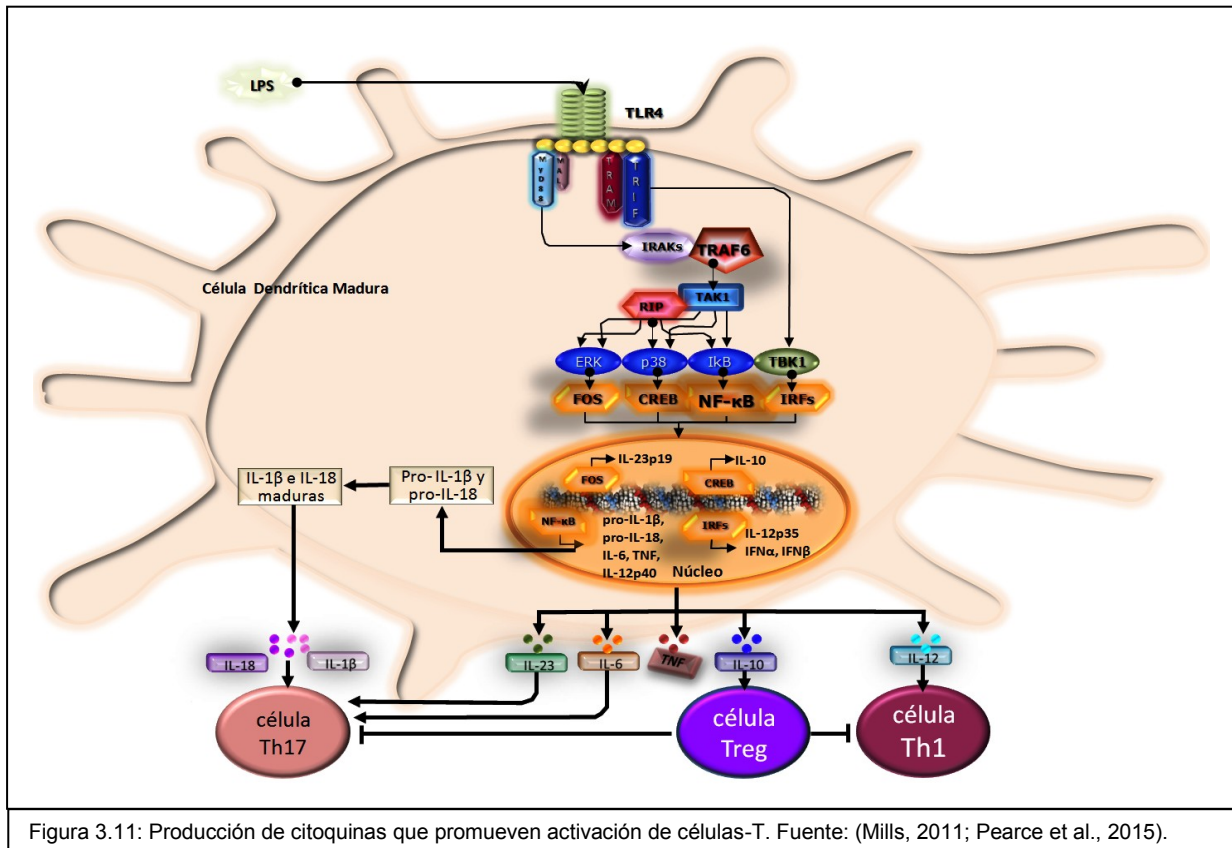
Las células del sistema inmune innato utilizan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), para identificar patógenos virales mediante la participación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PRRs responden ante firmas o sellos presentes en los virus, tal como es el caso de “5'-triphosphate RNA”, que normalmente no se encuentra en el RNA del huésped o ante ácidos nucleicos tales como DNA viral que está expuesto a los detectores localizados en el citoplasma. Los receptores TLRs son proteínas transmembrana tipo-1 que transitan entre la membrana del plasma y las vesículas endosomales, las cuales son responsables principalmente de la detección PAMPs en el medioambiente intracelular. Los ácidos nucleicos son detectados en el endosoma donde muchos virus desnudan sus genomas y entran al citoplasma. Al alcanzar el citoplasma, los componentes virales están sujetos al escrutinio de receptores RLRs (*RIG-I like receptors*), NLRs (*Nod-like receptors*) y sensores citosólicos DNA, tal como los miembros de la familia AIM2. En contraste, NLRs y AIM2 son los responsables principales por la maduración de IL-1 β e IL-18 a través de la activación de caspasa-1. Las formas inmaduras de IL-1 β e IL-18 son inducidas por los TLRs, mientras que NLRs actúan como un “punto de control”, regulando la activación y liberándose de estos potentes efectores. Adicional a la producción de moléculas pro-inflamatorias, muchas clases de PRRs movilizan la respuesta del sistema inmune adaptativo mediante el incremento en la expresión de MHC clase II y la inducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86. Los receptores de señal TLRs, reclutan proteínas adaptadoras que inician cascadas de señalización, las cuales culminarán con la activación de NF- κ B, MAPK y factores reguladores de interferones (IRF3, IRF5, IRF7). Junto con estos factores de transcripción, los TLRs no solo dirigen la expresión de interferones, citoquinas y quimioquinas, sino que también influyen en los procesos de maduración y sobrevivencia celular (Thompson et al., 2011).

3.1.4.1. Producción de citoquinas que promueven activación de células-T

La producción de citoquinas que promueven la diferenciación de células-T y su relación con los receptores TLRs, se explican a continuación. La descripción y detalle funcional de cada uno de los componentes que se refieren en el proceso, pueden ser revisados en el libro anexo-1, capítulos II y III, y la interacción específica con HPV16 puede ser revisada en el libro anexo-2, capítulo IV. La [figura 3.11](#) resume este proceso. El modelo de vida artificial HPV16-ALIFE considera estos lineamientos en su implementación, para las TLRs 3, 4, 7/8 y 9.

Todos los TLRs usan MyD88 como proteína adaptadora, con excepción de TLR3. Además, TLR2 y TLR4 usan TIRAP, mientras que TLR3 utiliza TRIF. TLR4 también hace uso de TRIF y TRAM. MyD88 se asocia con IRAK1 e IRAK4 y recluta TRAF6. Este complejo recluta TAK1, conduciendo a la fosforilación de I κ B, activación de NF- κ B y posterior transcripción de un rango de genes que codifican para producir citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF, IL-6, pro-IL-1 β y pro-IL-18. Los agonistas TLR activan la vía IRF conduciendo a la producción de IL-12p35 e IFN tipo I. La activación de TAK1 también resulta en fosforilación de MAPKs, incluyendo p38 y ERK. La fosforilación de p38 activa CREB, conduciendo a la producción de IL-10. La fosforilación de ERK promueve la transcripción del gen que codifica IL-23p19 y posterior síntesis de IL-23. La producción de citoquinas en respuesta a la activación TLRs conduce a la activación de varias poblaciones de células-T. IL-12 promueve la diferenciación de células Th1, IL-10 induce células Treg, e IL-1, IL-6, IL-18 e IL-23 promueven la

diferenciación o proliferación de células Th17. La producción de IL-10 y la proliferación de células Treg, inhiben las células Th17 y Th1. Además, la producción de células Treg inhibe la producción de células Th1 y de células Th17 (Mills, 2011; Pearce et al., 2015).



3.1.4.2. Activación de células-T dependientes de TLRs

El procedimiento se activa cuando se detecta una población de células infectadas por HPV16. Detectada la infección, se desencadena la activación de células-T dependientes de TLRs, de la forma que a continuación se resume. La [figura 3.12](#) muestra una representación de este proceso.

Los patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs), en nuestro caso el patógeno es HPV16, se unen a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), incluyendo TLRs. La activación TLR promueve la expresión de moléculas MHC y moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 por parte de células dendríticas, conduciendo de esta forma a la maduración de DCs. Las DCs maduras pueden activar nuevas células-T. Las DCs y macrófagos activados por TLRs, actúan como fuente de citoquinas immuno-moduladoras para orientar el proceso de diferenciación hacia células ayudadoras Th1 o Th17. La interleuquina-12 (IL-12) derivada de macrófagos y DCs, promueve la diferenciación de nuevas células-T entre células Th1, ya sea de forma directa o por medio de la producción de interferón-gamma (IFN-γ) a partir de células NK (*natural killer*). Una vez se activan las células Th1 secretan IFN-γ. Citoquinas IL-6 y TGF-

β , promueven la diferenciación de nuevas células-T entre células Th17. Luego IL-23, en sinergia con IL-1 α , IL-1 β o IL-18, activan células Th17, induciendo su proliferación y secreción de IL-17. Las células-T $\gamma\delta$, también secretan IL-17, IL-21 e IL-22, luego de la estimulación por IL-23 junto con IL-1 α , IL-1 β , o IL-18 (las cuales son liberadas por DCs o macrófagos activados por PAMPs), lo cual no requiere asociación física entre las DCs y las células-T $\gamma\delta$, o estimulación a través del compromiso con TCR. IL-21 e IL-17 producidas por células-T $\gamma\delta$, estimulan luego la diferenciación de células Th17 (Mills, 2011).

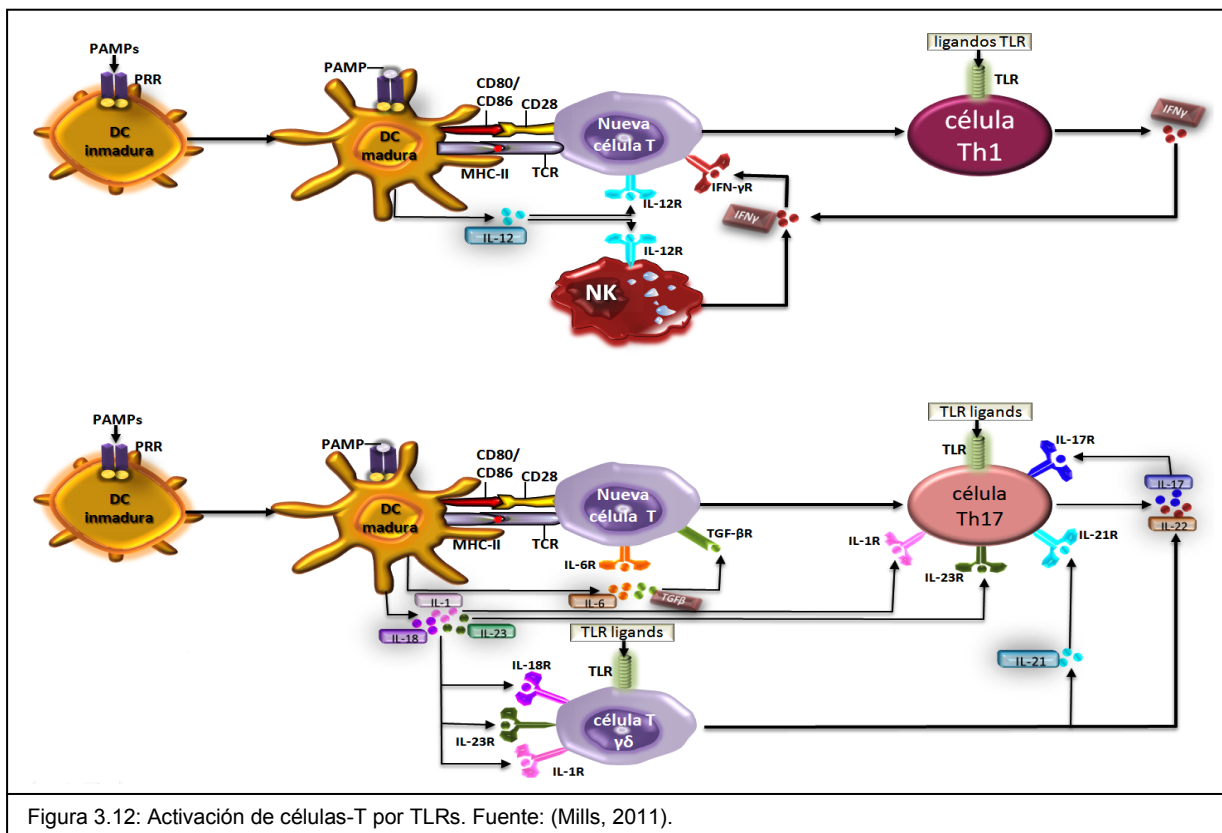


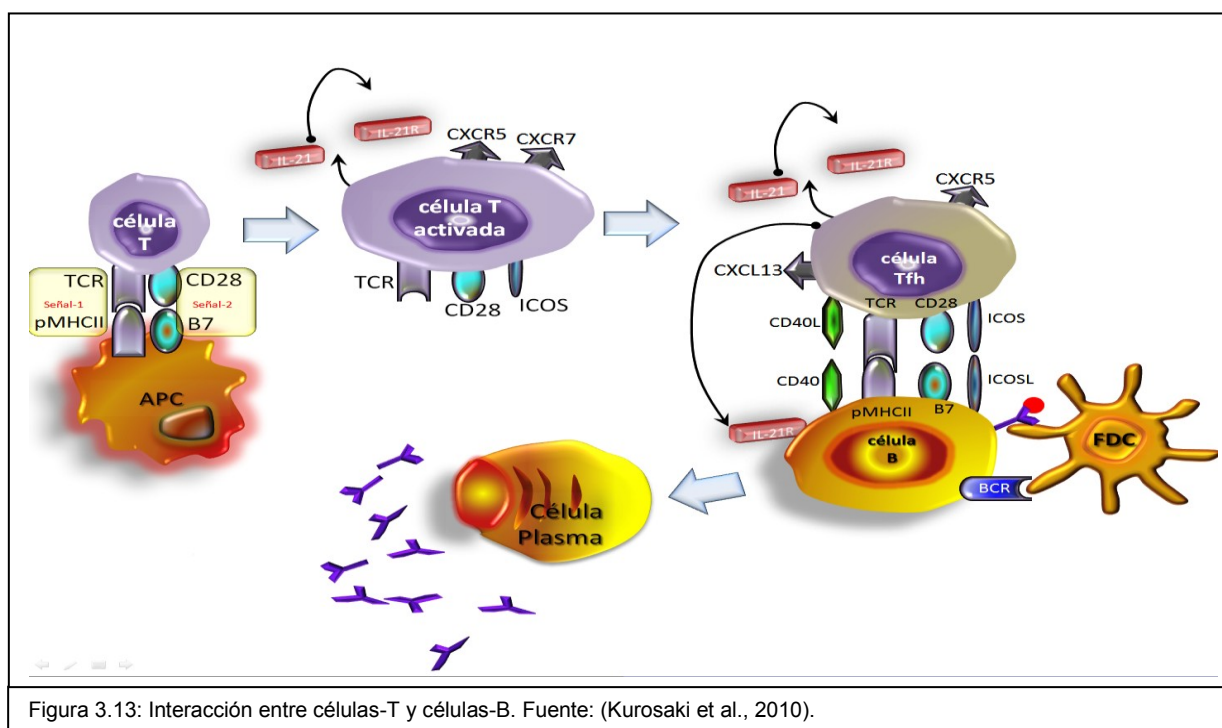
Figura 3.12: Activación de células-T por TLRs. Fuente: (Mills, 2011).

3.1.4.3. Dinámica entre grupos celulares que activa respuestas inmunes innatas y adaptativas

Existe evidencia que muestra que agonistas TLRs pueden actuar directamente sobre células-T CD4⁺, generando interacciones entre poblaciones de células-T y células-B. A continuación se resume esta dinámica. La [figura 3.13](#) muestra esta interacción. Información más detallada de este proceso se encuentra en el libro anexo-1, capítulo I.

En la zona de tejidos linfoides, las DCs maduras que expresan CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), presentan el ligando conformado por el complejo péptido-MHC clase II (pMHCII), ante el receptor TCR de nuevas células-T CD4⁺. En este ambiente, se unen las moléculas y receptores de células presentadoras de antígeno y células-T CD4⁺, es decir, pMHCII con TCR y B7 (CD80/CD86) con CD28, conduciendo de esta forma a la activación de células-T CD4⁺.

Las células-T CD4⁺ activadas, producen IL-21 e inducen la expresión de CD28 e ICOS. La señalización sostenida de células-T CD4⁺ activadas a través de TCR, CD28 e IL-21R, en la zona de células-T y en la interface entre células-T y células-B, conduce a la modulación de la expresión de receptores quimioquina, tales como CXCR5 (CD185, producido por células-B y DCs) y CCR7 (CD197, producido por células NK, Th2, Tfh, Th17), y además receptores co-estimuladores incluyendo ICOS (CD278, expresado por Th1, Th2, Tfh, Th17), CD40L (CD154, expresado por Tfh), y OX40 (CD134, expresado por Tfh y Treg). Las células-T ayudadoras foliculares (Tfh) migran hacia los folículos, y la entrega de la ayuda Tfh coadyuva en la selección y diferenciación de células-B activadas en centros germinales. En este ambiente, se unen las moléculas y receptores de células Tfh y células-B, es decir, pMHCII con TCR, CD40 con CD40L, e ICOS con ICOSL. Una vez activas las células-B por la ayuda de células Tfh, se produce la diferenciación de células-B hacia células plasma para que luego, éstas últimas activen la producción de anticuerpos específicos de antígeno (Kurosaki et al., 2010).



3.1.4.4. Dinámica de la reacción en centro germinal (GC)

Los centros germinales (GCs), son estructuras temporales que se forman dentro de los órganos linfoides periféricos, en respuesta a un antígeno dependiente de células-T. Dentro de los GCs tienen lugar tres (3) importantes procesos, que a continuación se resumen y se presentan en la [figura 3.14](#). Información más detallada de este proceso se encuentra en el libro anexo-1, capítulo I.

Las células-B y células-T son activadas por reconocimiento de su antígeno afín, en el folículo primario y zona-T, respectivamente, conduciéndolas al establecimiento de interacciones de

estado estable y permitiendo a las células-B recibir señales de ayuda a partir de células-T CD4+ afines. Una vez activas, las células-B y células-T migran a la región inter-folicular, donde las células-B se someten a proliferación y se da inicio a su interacción. Las poblaciones de células-B y células-T forman interacciones de larga vida, resultando en la activación completa de células-B. Las células-T adquieren las características del fenotipo de células-T ayudadoras foliculares (Tfh). Luego las Tfh migran desde la región inter-folicular hacia el folículo. Algunas células-B activadas por antígeno que proliferan, se diferencian entre células que secretan anticuerpos o plasmoblastos tempranos, que luego se mueven a la región adyacente al seno sub-capsular. Posteriormente, las células-B migran desde la región inter-folicular hacia el centro del folículo, el cual es caracterizado por una red de células dendríticas foliculares (FDCs), donde comienzan a proliferar, y como resultado empuja las células-B foliculares residentes a un lado, para formar el centro germinal temprano, el cual consta de blastos de células-B rodeado por la zona del manto. Esta estructura también es referida como el folículo secundario, diferenciándose de esta forma del folículo primario (sin centro germinal). Las células-B precursoras de centro germinal activadas por antígeno, forman el centro germinal temprano, en el cual ellas se diferencian entre blastos, que a lo largo de los siguientes días se someterán a expansión clonal, hasta que forman el centro germinal maduro, el cual se caracteriza por una zona oscura y una zona clara, lo cual ocurre aproximadamente a los siete (7) días de iniciar este proceso (De Silva et al., 2015; Kurosaki et al., 2015).

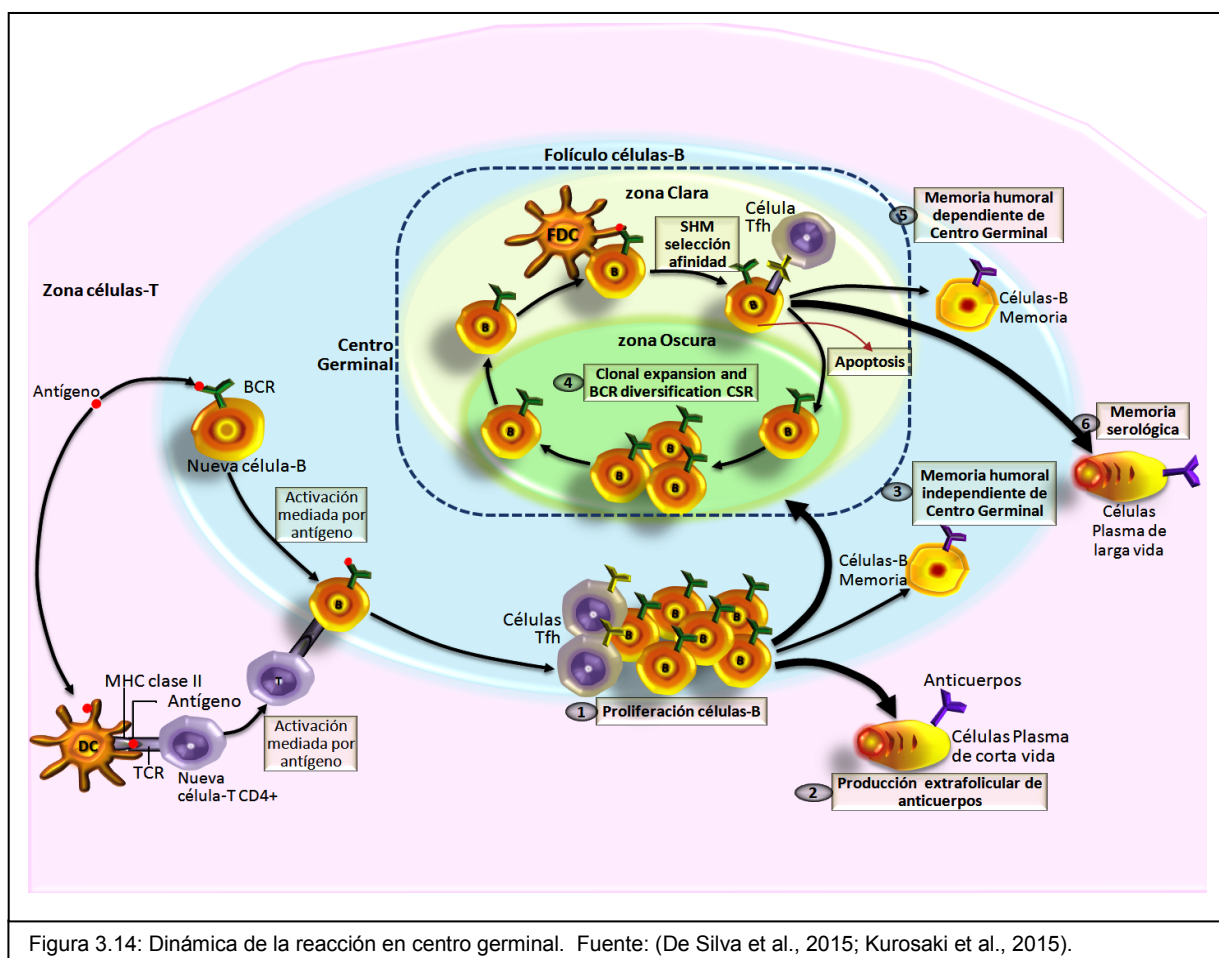


Figura 3.14: Dinámica de la reacción en centro germinal. Fuente: (De Silva et al., 2015; Kurosaki et al., 2015).

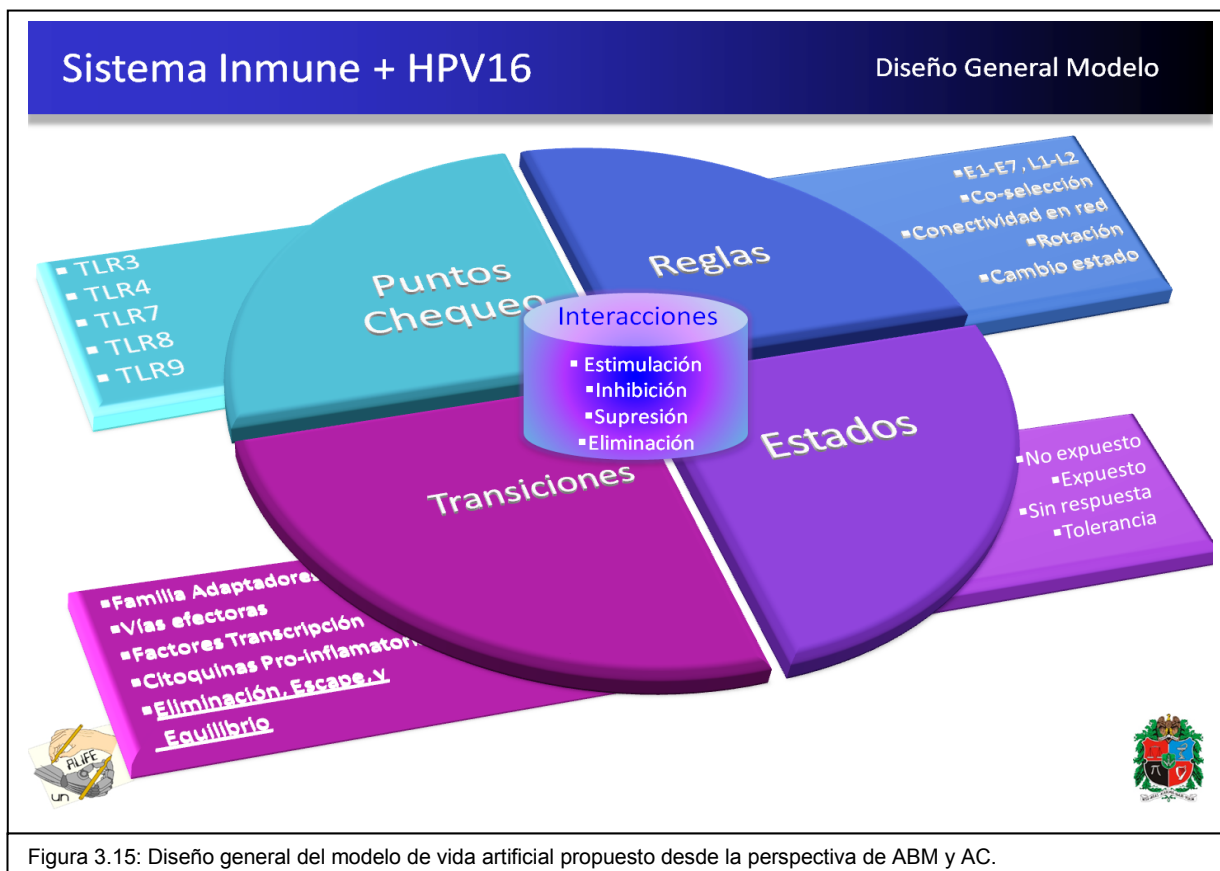
En la zona oscura del centro germinal, la expansión clonal de células-B específicas de antígeno, está acompañada por la diversificación del receptor de células-B (BCR), a través del proceso de hipermutación somática. Las células-B que salen del ciclo se relocalizan en la zona clara del centro germinal. Durante la proliferación de células-B, el proceso de hipermutación somática (SHM), introduce cambios de pares de bases entre la región V(D)J del reordenamiento de región variable de genes inmunoglobulina. Algunas de estas mutaciones de pares de bases conducen a un cambio en la secuencia de aminoácidos. Las células-B de zona oscura luego se mueven a la zona clara (De Silva et al., 2015; Kurosaki et al., 2015).

En la zona clara del centro germinal, tiene lugar el proceso de selección de afinidad, donde el receptor de células-B (BCR), con ayuda de células inmunes, incluyendo células-T ayudadoras foliculares (Tfh) y células dendríticas foliculares (FDCs), es seleccionado para mejorar la unión al antígeno de inmunización. Entre las células-B de zona clara nuevamente generadas, que expresan BCR mutante, resultante de la hipermutación somática en la zona oscura, el BCR de mayor afinidad es directamente asociado con una mayor captura de antígeno, que lo conduce a una mayor densidad de complejos péptido-MHCII presentados sobre la superficie de la célula-B. Esto resulta en la mayor participación de la ayuda de células-T, lo cual a su turno, conduce a la selección positiva. Por lo tanto, células-B de zona clara generadas nuevamente, que producen un anticuerpo desfavorable, son incapaces de capturar suficiente antígeno y se someten a apoptosis. Continuando el proceso de selección positiva, un subgrupo de células-B de zona clara, son instruidas para recircular en zona oscura. Las células-B de zona clara pueden someterse a recombinación de cambio de clase (CSR), antes de la re-circulación de zona clara a zona oscura, mientras que otras células cambian y se diferencian directamente. En la zona oscura, estas células se someten a proliferación e hipermutación somática, adicionales, generando de esta forma potenciales anticuerpos mutantes con una afinidad mejorada. La re-circulación entre la zona oscura y la zona clara facilita varias rondas iterativas de mutación y selección, y dentro de corto tiempo, se conduce a la generación de células-B de memoria y células plasma de alta afinidad. Las células-B de zona clara seleccionadas por antígeno, eventualmente se diferencia entre células precursoras de células-B de memoria y plasmoblastos, las cuales son precursoras de células plasma (De Silva et al., 2015; Kurosaki et al., 2015).

Durante los días cinco (5) y seis (6), el centro germinal se expande rápidamente como resultado de la rápida proliferación de los blastos de células-B. El día siete (7), se forman las zonas oscura y clara, las cuales resultan en el establecimiento del centro germinal maduro. La zona oscura consta principalmente de blastos de células-B densamente empacados, mientras que la zona clara contiene células Tfh, FDCs, DCs, moléculas CD40, CD40L, y receptores de células-T (TCR). La fuerza de las señales que las células-B reciben, probablemente determine su destino. Las señales más fuertes favorecen el desarrollo de células plasma o células-B de centro germinal, mientras que las señales débiles determinan la diferenciación de células-B de memoria (De Silva et al., 2015; Kurosaki et al., 2015).

3.1.5. Estados y transiciones

La [figura 3.15](#), muestra en forma resumida, los conceptos claves que aplican a puntos de chequeo, conjunto de reglas, estados y transiciones aplicados al modelo de vida artificial propuesto, los cuales se explican a continuación.



3.1.5.1. Puntos de chequeo

Los principales puntos de chequeo están dados por la activación de los receptores TLRs que reconocen PAMPs virales, estos son TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, además de TLR4, considerando que una vez se activan, estimulan la transcripción de genes inflamatorios y desencadenan vías de señalización, los cuales conducen a la estimulación de factores de transcripción que permiten la secreción de cinco (5) posibles familias de citoquinas que coadyuvan a la manifestación o no, de una respuesta inmune innata y adaptativa (ver detalle de sus vías de señalización en el libro anexo-1, capítulo II y en el libro anexo-2, capítulo IV), dado que se ven influenciadas por la acción de las oncoproteínas expresadas por HPV16.

Los TLRs también se definen como el punto de chequeo más importante, los cuales son representados en el segundo nivel del modelo de vida artificial propuesto, dado que permite la interacción entre éstos receptores y el HPV16 a través de sus oncoproteínas, y también activa la dinámica con el primer nivel (celular) del modelo a través de la infección de queratinocitos y modulación de otras poblaciones celulares bajo su condición infecciosa, y con el tercer nivel (citoquinas) mediante la secreción y bloqueo de algunas citoquinas que modifican el microambiente y generan los ciclos de retroalimentación positivo y negativo entre las poblaciones celulares involucradas.

3.1.5.2. Reglas

En lo que respecta al ciclo de vida del HPV16, las reglas están dadas por las funciones de las proteínas que expresa el virus, E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2. Este proceso se encuentra ampliamente documentado en (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013).

En general, los componentes del modelo de vida artificial propuesto, se rigen por las siguientes reglas: co-selección, conectividad en red, rotación, supresión, y cambio de estados.

La co-selección, un término introducido por G.W. Hoffmann en su teoría de la red inmune, que denota la selección mutua positiva de miembros individuales dentro de poblaciones celulares dispersas, de tal forma que la selección de los miembros dentro de cada población definida es dependiente de las interacciones con el reconocimiento de uno o más miembros dentro de otras poblaciones. Por ejemplo, una población de células-T positivas reconoce el antígeno, e interactúa con una población diversa de células-T negativas (Hoffmann, 2011).

La conectividad en red, propuesta por G.W. Hoffmann en su teoría de la red inmune (Hoffmann, 2011), señala que el estado suprimido es un estado de alta conectividad en red. El estado inmune, es un estado de baja conectividad porque las células específicas de antígeno se encuentran marcadas. El estado virgen tiene potencial para cambiar a un estado suprimido o a un estado inmune, mientras que es más complejo el cambio de un estado inmune a un estado suprimido, o viceversa. En estado virgen, las células-T con bajo nivel de conectividad actúan como ayudadoras y con un alto nivel de conectividad actúan como supresoras. El modelo de vida artificial propuesto trabaja con este concepto, asumiéndolo como una regla bajo la cual se permite el control de los diferentes estados que surgen a partir de la interacción entre los diferentes componentes y entre las diferentes redes. A nivel de redes, se cuenta con una red de poblaciones celulares, una red de citoquinas, y una red de receptores TLRs. A nivel de estados, la conectividad en red permite el control de los encuentros entre poblaciones que marcan las condiciones de cambio de estos estados, generalmente identificadas por activación o no, de moléculas de superficie. Tal es el caso de los encuentros entre poblaciones de DCs y antígenos, DCs y células-T específicas de antígeno, células-T y células-B específicas de antígenos, entre otras interacciones que se encuentran documentadas en el numeral 3.1.2.1, del presente documento.

La rotación de las poblaciones celulares surge a partir de los procesos de diferenciación, proliferación y eliminación. La diferenciación se ve afectada directamente por los niveles de expresión de diferentes citoquinas que definen tipos de poblaciones celulares específicas, tal es el caso de la diferenciación de células-T ayudadoras (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh) y células-T reguladoras (Treg). La proliferación celular se encuentra vinculada a una tasa de divisiones según el tipo de población y condiciones del microambiente. La eliminación celular se presenta en respuesta a la activación de procesos de muerte celular programada o apoptosis inducida por las interacciones de elementos del microambiente, tal es el caso que se puede presentar entre CTLs y queratinocitos infectados.

En particular, las reglas específicas que afectan todos los procesos implementados obedecen a condiciones biológicas, previamente documentadas por la comunidad científica, las cuales se refieren explícitamente en cada uno de los procesos que se detallan en los libros anexos-1 y anexo-2. Adicionalmente, dentro del código del modelo se introducen las referencias correspondientes.

3.1.5.3. Estados

En lo que respecta al ciclo de vida del HPV16, sus estados se encuentran ampliamente documentado en (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013).

Desde la perspectiva del huésped, el modelo de vida artificial propuesto, considera cinco (5) posibles estados estables de las poblaciones celulares, a saber: estado virgen, estado suprimido, estado inmune, estado auto-inmune y estado de tolerancia, cuyo alcance corresponde al propuesto por G.W. Hoffmann en su teoría de la red inmune (Hoffmann, 2011).

En el estado virgen, es decir, aquel en que el huésped no ha sido expuesto al patógeno, se asume que el sistema se mantiene en balance por eliminación mutua entre clones de especificidades complementarias y se involucran anticuerpos IgM e IgG por la importancia que tienen dentro del estado virgen. La vida útil de las células-B depende de su entorno e interacción con el microambiente, modulado principalmente por la expresión de citoquinas. Por ejemplo, TGF juega un rol protector y la apoptosis mediada por BCR y CD40 se induce después de la recombinación de cambio de clase. En este estado, se ha observado la apoptosis en presencia de CD40 y BCR después de tres (3) o cuatro (4) días (Gao et al., 2012), además se reporta que IL-21 también tiene efectos pro-apoptóticos sobre células-B estimuladas con anticuerpos específicos CD40 (Leonard et al., 2005). Como este caso, todos los eventos biológicos implementados en el modelo HPV16-ALIFE, corresponden a situaciones validadas por la comunidad científica, y documentadas en las publicaciones correspondientes, las cuales son presentadas en detalle en libro anexo-2. El estado virgen se perturba con la detección de estado de infección, el cual es activado por medio de la interacción entre PAMPs y TLRs.

El estado suprimido, cuenta con elevados niveles de células-T positivas y negativas, y su estimulación mutua conduce a un significativo nivel de expresión de sus receptores, moléculas y citoquinas. Estos componentes, en su condición negativa bloquean receptores positivos, y los componentes positivos bloquean los receptores negativos. En estado suprimido, los receptores de células-B específicas son bloqueados y estos bloqueos son generados por la expresión de algunas citoquinas.

El estado inmune o estado de exposición al antígeno, está caracterizado por elevados niveles de poblaciones celulares positivas y agotados niveles de poblaciones celulares negativas. En el modelo HPV16-ALIFE, la población celular que es infectada por el virus HPV16 corresponde a los queratinocitos y en caso de infección persistente reportan elevados niveles de proliferación, en cambio otras poblaciones se ven disminuidas, tal como sucede con poblaciones CTLs y NKs.

El estado auto-inmune es simplemente lo contrario al estado inmune. Está caracterizado por altos niveles de clones negativos y agotados niveles de células positivas.

El estado de tolerancia, se define como la falta de respuesta que ocurre sin que la supresión esté siendo demostrada. Células en estado virgen e inmune se combinan para producir un estado sin respuesta (anergia).

El cambio de estado se define a partir de los diferentes componentes (por ejemplo, receptores, factores, TLRs, citoquinas) que estimulan o anulan las condiciones de proliferación,

diferenciación y eliminación de las poblaciones celulares, modificando por ende los grados de interacción entre componentes y poblaciones.

Desde la perspectiva de la célula, como miembro de una población celular, el modelo de vida artificial propuesto considera los siguientes estados de la célula: inmadura, madura, sana, infectada, secretando citoquinas, en transcripción (infectando de una célula a otra, de una generación a otra), en replicación (copia de si misma), diferenciación (se adquiere un nuevo fenotipo y función), proliferación (multiplicación de una población celular), muerte (natural o por apoptosis).

3.1.5.4. Transiciones

En lo que respecta al ciclo de vida del HPV16, sus transiciones se encuentran ampliamente documentadas en (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013).

Frente a las diferentes poblaciones celulares que intervienen en el modelo de vida artificial, las transiciones de cada población se ven afectadas por los procesos de proliferación, diferenciación y eliminación, la influencia que ejercen la expresión de moléculas particulares en cada población celular, las redes de citoquinas, y vías de señalización desencadenadas por los TLRs.

Los procesos de proliferación, diferenciación y eliminación, así como también, las moléculas y citoquinas que cada población expresa, junto con el perfil y funciones de cada una de las cinco (5) familias de citoquinas consideradas en el modelo (TNF, TGF, IFNs, MIF e interleuquinas), se encuentran ampliamente documentadas en el libro anexo-1.

Con relación a los TLRs, y considerando que estos son implementados bajo el concepto de modelos basados en agentes, es importante especificar que las transiciones estarán marcadas por las percepciones, sensores, agentes, actuadores y acciones, propias de este concepto bajo la técnica de vida artificial.

Las percepciones se originan en el microambiente en el que se realizan las interacciones entre poblaciones celulares, acciones del HPV16 y redes de citoquinas. Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) derivados del huésped, son moléculas endógenas normalmente encontradas en células que son liberadas durante la necrosis, entre las cuales se incluyen algunas citoquinas. En contraste, los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs), son derivados del patógeno, regularmente esenciales para su sobrevivencia. Los DAMPs son reconocidos por varias clases de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales incluyen receptores Toll-like (TLRs). Los TLRs son receptores que identifican PAMPs (Newton et al., 2012; Zamarin et al., 2015), entre otros, aquellos que reconocen virus (ver información ampliada en libro anexo-1, capítulo II). De esta forma, el microambiente contiene señales PAMPs virales que son detectadas por TLRs (agentes) en el ambiente extracelular y endosomal. En combinación con diferentes adaptadores moleculares (tales como MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM), los cuales asumen el rol de actuadores en el modelo de vida artificial, los diferentes TLRs desencadenan sus vías de señalización, a través de las cuales se induce a la activación de factores de transcripción (tales como IRFs, CRB, AP-1, NF-kB), vías efectoras (tales como NF-kB) y citoquinas (tales como IFNs e ILs). Información detallada de estos componentes puede ser encontrada en el libro anexo-1, capítulos II y III.

Eliminación, escape y equilibrio. Cada uno de los niveles implementados en el modelo considera una condición de transición que se convierte en criterio clave en cada uno de ellos. En el primer nivel, donde se controla la diferenciación, proliferación y apoptosis, el criterio clave es eliminación, toda vez que este criterio garantiza la rotación de las poblaciones celulares y por ende la dinámica del modelo. En el segundo nivel, que corresponde a las vías de señalización de TLRs, en el cual se da la interacción con las oncoproteínas virales, el criterio clave es escape, toda vez que las oncoproteínas inhiben algunas acciones del sistema inmune que le facilita al virus evadir su control. En el tercer nivel, correspondiente a la expresión de citoquinas, el criterio clave es equilibrio, dado que la efectividad de la respuesta inmune se ve afectada por el balance o desbalance que se produzca entre el grupo de citoquinas pro-inflamatorias y citoquinas anti-inflamatorias.

3.1.5.5. Interacciones

La interacción más general se presenta entre el virus HPV16 y el sistema inmune del huésped. Frente al HPV16, las interacciones se presentan entre poblaciones celulares, TLRs y citoquinas (información biológica detallada en el libro anexo-2). Con relación a TLRs, las interacciones se generan entre vías efectoras, moléculas, factores de transcripción y citoquinas. No obstante, estos entrecruzamientos hacen parte de cuatro (4) interacciones principales, definidas como: estimulación, inhibición, supresión y muerte.

En estimulación, un componente del modelo hace que el otro con el cual interactúa, se active y produzca una acción afín a su función natural. En inhibición, sucede lo contrario, un componente del modelo hace que el otro con el cual interactúa, quede bloqueado temporalmente y no sea capaz de realizar su función natural, mientras esta interacción permanezca activa. En supresión, un componente impide la acción de su contraparte (ejemplo, función pro-apoptótica vs. anti-apoptótica; pro-inflamatoria vs. anti-inflamatoria). En condición de muerte, el componente desaparece del modelo (ejemplo, muerte celular).

3.1.6. Descripción del modelo lógico

El modelo de vida artificial propuesto, define una lógica específica para el establecimiento del nivel de maduración de afinidad, y para que se habilite una posible interacción entre poblaciones celulares. A continuación se explican estos dos (2) tópicos.

3.1.6.1. Lógica en la predicción de maduración de afinidad

El proceso de mutación somática por el cual las células-B son seleccionadas para sobrevivir y proliferar se basa en el grado de afinidad con el antígeno, siguiendo interacciones con complejos inmunes que están asociados con células dendríticas foliculares y su capacidad para desencadenar ayuda de células-T foliculares, que luego activan el proceso de recombinación de cambio de clase o diferenciación entre células-B de memoria o plasma. La hipermutación somática (SHM) es un proceso principalmente aleatorio. El beneficio de la hipermutación somática para la maduración de afinidad, es atenuado por la generación de clones de células-B en centros germinales (GC) que expresan BCRs auto-reactivos. En contraste a los mecanismos de tolerancia que controlan el desarrollo de células-B, el medio

por el cual las células-B GC auto-reactivas son eliminadas, es poco entendido. El entendimiento del mecanismo de maduración de afinidad es de gran importancia para el desarrollo de estrategias mejoradas de vacunas, tal como se explica en el numeral 3.1.4.4_Dinámica de la reacción en centro germinal, donde se observa que las células Tfh proporcionan señales fundamentales para que células-B del GC de alta afinidad faciliten su selección, su tránsito y división en la zona oscura. Se ha observado que la integración de diferentes señales proporcionadas por células-T controla la maduración de afinidad en el tiempo. No obstante, la naturaleza exacta de estas señales permanece sin aclarar (De Silva et al., 2015).

Por lo anterior, el modelo propuesto define tres (3) categorías que establecen el grado de maduración de afinidad, esto es: baja, media y alta. Dado que SHM es un proceso principalmente aleatorio, el modelo HPV16-ALIFE controla la maduración de afinidad generando un aleatorio que permite diferenciar los tres (3) niveles referidos.

3.1.6.2. Interacciones específicas

El cruce de receptores es un mecanismo de activación de poblaciones de células-B y células-T, lo cual constituye una interacción estimuladora. Los linfocitos por sí mismos son antígenos eficientes, dado que tienen un gran número de receptores específicos sobre su superficie, receptores que se pueden entrecruzar con otros linfocitos. Frente a los linfocitos con receptores mutuamente complementarios, se puede esperar que se estimulen mutuamente para proliferar o para secretar moléculas específicas (Hoffmann, 2011).

El modelo HPV16-ALIFE, produce la activación de células de poblaciones específicas con base en este concepto. Una célula que se complementa con otra, modifica el estado de sus receptores afines. Cuando una célula resulta de un proceso de diferenciación o proliferación, sus receptores se encuentran en estado cero (0), el cual denota inactividad. Una vez se activa la célula a través de los procesos definidos, su estado cambia a uno (1), y cuando se genera una interacción exitosa los respectivos receptores y moléculas cambian a un estado dos (2). Adicionalmente, las variables definidas en las poblaciones celulares del modelo, conservan la traza que permite evidenciar qué tipos de células y receptores se acoplan, como resultado de sus interacciones. Tal es el caso que resulta de los procesos de interacción entre DCs y antígenos, DCs y células-B específicas de antígeno, células-T y células-B específicas de antígeno, entre otras interacciones implementadas en el modelo que más adelante se detallan.

En la actividad inhibidora o de bloqueo, los componentes positivos bloquean receptores negativos y viceversa. Tal es el comportamiento definido para la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y/o anti-inflamatorias. En el modelo propuesto, cuando la expresión de una citoquina se encuentra activa, su estado será identificado con un valor igual a uno (1), y por el contrario, cuando su estado sea de inactivación y haya sido bloqueada por algún elemento del ambiente, su estado cambiara a cero (0).

En la actividad de muerte o eliminación, las poblaciones celulares responderán a los procesos de muerte celular programada, activada como una condición de muerte natural, o muerte por apoptosis, la cual dependerá de los eventos del microambiente resultado de las interacciones entre poblaciones celulares, del tipo de población celular afectada y del estado de algunos marcadores específicos.

3.1.6.3. Paso a paso en la construcción del modelo

En la siguiente sección, se explica cómo interpretar la interface que corresponde al microambiente en que se desarrollan e interactúan las poblaciones celulares, y las redes de TLRs y citoquinas, que hacen parte del prototipo desarrollado. Así mismo, se relacionan las diferentes etapas que sigue el prototipo construido, en cada uno de los niveles que se representan.

Paso 0. Preparar ambiente. La [figura 3.16](#), muestra la interface de usuario final correspondiente al mundo en que se desarrollan las poblaciones de células, TLRs y citoquinas, e interactúa el ciclo de vida del HPV16, la cual corresponde a una representación esquemática en que ocurre los movimientos de células-B específicas de antígeno y células-T en ganglios linfáticos, durante la respuesta inmune ante un modelo antígeno, y donde también tienen lugar los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis celular.

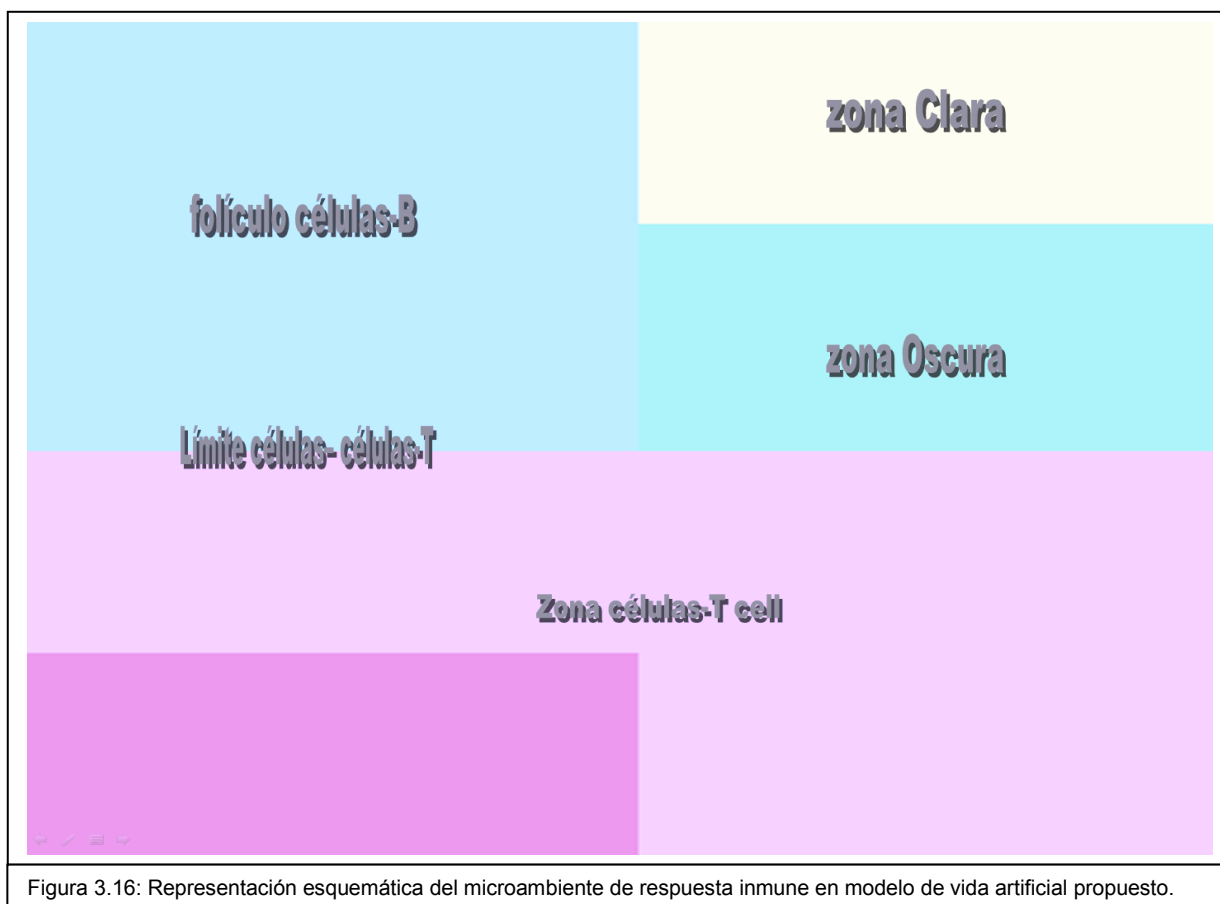


Figura 3.16: Representación esquemática del microambiente de respuesta inmune en modelo de vida artificial propuesto.

Haciendo una analogía con la [figura 3.14](#), en la que se observa la dinámica de centro germinal, a continuación se explica el sentido que tiene los colores utilizados en el prototipo del modelo de vida artificial propuesto. La mitad inferior de la malla, en color rosado claro, representa la zona-T. La mitad superior izquierda en color azul claro, representa la zona-B

folicular. La mitad superior derecha representa la zona de interacción de centro germinal (GC), la zona en color amarillo claro representa la zona clara dentro del GC, y la zona en color verde claro representa la zona oscura dentro del GC.

En esta etapa, el modelo activa su población inicial, considerando lo expuesto en el numeral 3.1.2.1.1. *Población inicial*, y los valores que se definen en el deslizador en la interface del modelo, identificado con la etiqueta *“Initial_Population”*. A partir de estos parámetros, la población inicial estará conformada por células-B, células-T y células dendríticas, a partir de las cuales se generaran los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis, de acuerdo con la evolución de los microambientes celulares, TLRs y citoquinas, que serán activados una vez el virus sea detectado a través de la activación de una población de queratinocitos (KCs) que responderá a las reglas del ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16, según lo expuesto en el “Modelo de crecimiento de las variantes del virus de papiloma humano tipo 16” (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013; Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010).

3.1.6.3.1. Paso a paso primer nivel. Microambiente Celular

Considerando que el objeto del modelo es provocar una respuesta inmune ante la infección por el virus de papiloma humano tipo 16, los parámetros iniciales por defecto asumen una infección previa por HPV16, no obstante, se cuenta con un interruptor que permite cambiar esta condición. A continuación se describen los pasos que sigue el modelo y se especifica la acción que se valida como pre-requisito para desencadenar la acción.

Paso 1. Activación población KCs y reconocimiento del patógeno (HPV16).

Pre-requisito: Infección HPV16 activa.

Bajo la condición de infección HPV16 positivo, el modelo simula la interacción entre DAMP-PAMP-TLRs. Según lo explicado en el libro anexo-2, capítulo II, HPV infecta exclusivamente queratinocitos (KCs) de la capa basal de la epidermis y epitelio mucosal. Los KCs basales expresan PRRs, tales como receptores Toll-Like (TLRs), receptores NOD-like (NLRs) y helicasas RNA, para reconocer los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) sobre el virus. Los KCs expresan TLR3. Los receptores TLR7 y TLR8 no son expresados, pero la expresión TLR7 puede ser inducida por la ligadura TLR3. La expresión de TLR9 puede ser inducida después de la diferenciación terminal. Los KCs producen IFNs tipo I y citoquinas pro-inflamatorias sobre ligaduras PRRs, a través de vías de señalización IRF y NF- κ B de células-B activadas. Los IFNs tipo I estimulan células, para expresar células que inducen estado antiviral, las cuales también pueden estimular células dendríticas (Mills, 2011; Tummers et al., 2015).

En el modelo HPV16-ALIFE, se activa la población de queratinocitos (KCs) y se inicia el ciclo de infección del HPV16 de acuerdo con los parámetros explicados en detalle en (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013; Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010). Adicionalmente, se da inicio al proceso de presentación de activación de células presentadoras de antígenos (APCs), donde tiene lugar la habilitación de la población de DCs, razón por la cual el modelo activa sus moléculas de superficie (eBioscience, 2015). En este proceso de activación, el modelo actualiza el estado de las moléculas CD80, CD86, MHC-I y MHC-II, fijando un valor igual a uno (1).

Paso 2. Maduración DCs.**Pre-requisito: DCs activas.**

Durante las primeras ocho (8) horas, después de la entrada de DCs a ganglios linfáticos desde su circulación en sangre, se inician múltiples cortos encuentros entre DCs y células-T, para luego disminuir su motilidad (Mempel et al., 2004). La activación de NF- κ B resulta en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Mills, 2011). Las DCs se distinguen por su capacidad para producir IFN tipo I en respuesta ante infección viral, pueden producir IL-12 e inducir polarización de células-T (Degli et al., 2005), también expresan IL-36R (Vigne et al., 2012) y se ha mostrado que expresan constitutivamente IRF3 e IRF7 (Bonjardim, 2005).

Por lo anterior, en esta etapa en el modelo HPV16-ALIFE, las DCs activas se reconocen porque sus moléculas CD80, CD86, MHC-I y MHC-II se encuentran en estado uno (1), que de acuerdo con los parámetros definidos, significa estado activo. Además, se activa la expresión las siguientes citoquinas secretadas por DCs: IFN- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (IL-12p35, IL-12p40), IL-15, IL-18, IL-23 (IL-23p19), IL-27, TGF- β , TNF- α . También se activan los receptores IL-15R, IL-36R, y factores de crecimiento GM-CSF, IRF3 e IRF7.

Paso 3. Activación células-T precursoras activadas por antígeno (día 0).**Pre-requisito: DCs maduras activas y antígeno reconocido.**

Aún cuando DCs no presenten antígeno, las células-T se someten a interacciones durante el intervalo entre ocho (8) y doce (12) horas. Los marcadores y citoquinas sólo se expresan en presencia del antígeno, aunque se cree que la señalización TCR sí ocurre (Mempel et al., 2004). Varias de las citoquinas producidas en respuesta al virus activan diferentes grupos de células-T. Citoquinas IL-12 promueven la diferenciación de célula Th1, IL-10 induce células-T reguladoras (Treg), e IL-1, IL-6, IL-8 e IL-23 promueven la diferenciación o proliferación de células Th17 (Mills, 2011).

En el modelo HPV16-ALIFE, las células-T de la población inicial interactúan con las citoquinas que fueron activadas como resultado del reconocimiento del virus, lo cual activa los procesos de diferenciación de células-T. A partir de células-T CD4+, se generan los perfiles de diferenciación de las poblaciones de células Th1, Treg y Th17, con sus correspondientes moléculas de superficie en estado activo, listas para interactuar con otras poblaciones celulares. Como resultado, se modifica el estado de moléculas de superficie a estado activo, es decir fijándoles un valor de estado igual a uno (1): CD28, TCR e ICOS, los receptores: IL-21R, CD185 (CXCR5), CXCR7, IFN- γ R, IL-12R, TGF- β R, e IL-6R.

Paso 4. Interacción entre poblaciones DCs y T-CD4+ (Th0) (día 0).**Pre-requisito: DCs maduras activas y Th0 activas.**

Durante doce (12) horas posteriores a las horas de motilidad, se forman conjugados estables de larga duración entre DCs y células-T y se comienza a secretar IL-2 e IFN- γ . Es posible que las DCs retengan el péptido antígeno hasta por sesenta (60) horas después de la estimulación DC (Mempel et al., 2004). En la zona-T de tejidos linfoides, DCs maduras expresando CD80/CD86 presentan ligando péptido/MHC-II ante TCR de la nueva célula-T CD4+ (Th0) activada (De Silva et al., 2015; Kurosaki et al., 2015; Tarlinton, 2012;). Células-T CD4+ activadas por antígeno producen IL-21 e inducen la expresión de CD28 e ICOS (Tarlinton, 2012).

En esta etapa, el modelo HPV16-ALIFE identifica las DCs que aún no han ubicado una Th0 para establecer un posible vínculo entre sí, generando múltiples contactos durante las

primeras ocho (8) horas. Para el establecimiento de la sinapsis entre DCs y Th0s presentando antígeno, se establece el contacto temporal durante el cual se activan las moléculas de superficie en estado activo y se intercambia información para poder identificar las parejas afines. Desde las ocho (8) a veinticuatro (24) horas se activa la migración, y se produce la secreción de citoquinas IFN- γ e IL-2, a las veinte (20) horas. El modelo simula el establecimiento del contacto permanente, desplazando las DCs a la ubicación de las células Th0 y fija la unión modificando los valores de estado a dos (2), lo que significa que la unión entre las células DC y Th0 se ha cumplido. Las moléculas de DCs que cambian son: CD80/CD86 y pMHCII, y en células Th0: CD28 y TCR.

Si la interacción se habilita entre una célula DC y una célula Th0, la unión (estado = 2) activa la coincidencia de los siguientes receptores: CD80/CD86 (DCs) se une a CD8 (Th0s), MHC-II (DCs) se une a TCR (Th0s), IL-12 (DCs) se une a IL-12R (Th0s), IL-6 (DCs) se une a IL-6R (Th0s), TGF- β (DCs) se une a TGF- β R (Th0s). Adicionalmente se activa la expresión de las citoquinas: IL-4, IL-5 e IL-21, quedando el microambiente celular preparado para otras interacciones entre DCs y otras poblaciones de células-T (T-CD8+, Th1, Treg, Th17 y NKs) (ver paso 9).

Paso 5. Activar células-B mediadas por antígeno (día 0).

Pre-requisito: DCs maduras activas.

El modelo HPV16-ALIFE valida que la citoquina IFN- α (DCs) se encuentre activa para ejecutar el proceso de activación de células-B (BCs) mediadas por antígeno. Si la condición se cumple y se encuentran células-B aptas, se establece la activación modificando sus moléculas de superficie y uniéndose al antígeno. Al activarse las células-B, los receptores BCR se unen al antígeno, y se activan las moléculas CD40 y MHC-II.

Paso 6. Realizar desplazamiento de células-B y células-Th0 mediadas por antígeno a sus zonas correspondientes (día 1)

Pre-requisito: Célula-B activada y Th0 seleccionada.

Células-B y células-T son activadas por reconocimiento de sus antígenos afines en el folículo primario y en la zona-T, respectivamente. Las células-B y células-T migran hacia la región interfolicular y comienzan a interactuar (De Silva et al., 2015).

El modelo HPV16-ALIFE realiza el desplazamiento de las células-B y las células-T que cumplen con los requisitos a las zonas correspondientes, dando inicio a su interacción.

Paso 7. Activar interacción entre células-B y células-Th0, mediadas por antígeno (día 2)

Pre-requisito: Célula-B activada y Th0 seleccionada en zona específica.

Células-B y células-T activadas por antígeno migran hacia el borde entre la zona folicular de células-B y zona de células-T de órganos linfoides secundarios, respectivamente, lo cual las conduce al establecimiento de interacciones estables y le permite a las células-B recibir ayuda de las células-T CD4+. Las células-B y células-T activadas luego migran a los folículos externos, donde las células-B se someten a proliferación (Kurosaki et al., 2015). Desde el inicio de su proliferación, las células-T han realizado esta labor hasta por cinco (5) veces hasta este día, y desde entonces continúan haciéndolo (Mempel et al., 2004). Células-B (BCs) y células-T (Th0s) forman interacciones de larga vida, resultando en la completa activación de células-B, y las células-T adquieren las características del fenotipo Tfh (De Silva et al., 2015). La señalización sostenida de TCD4+ a través de TCR, CD28 e IL-21R en la zona-T y la interacción de células-T y células-B, conduce a la modulación de la expresión de receptores,

incluido ICOS (Tarlinton, 2012). La interacción a través de CD40 permite la activación de TLR7 y TLR9 (Isaza-Correa et al., 2014). En cuanto a las citoquinas es esta etapa, IL-7R es desregulado luego de la activación de células-T por su propio ligando (Akdis et al., 2011; eBioscience, 2015), IL-10 inhibe la producción de IFN- γ mediante células-T activadas (Shaikh, 2011). IL-19 induce la expresión de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 en células-T activadas (Akdis et al., 2011). Producto de la interacción, se activan las citoquinas: IL-2, IFN- γ (Mempel et al., 2004). Si CXCR5 se encuentra expresado, las Th0s tempranas migran al borde del folículo de células-B y se someten a diferenciación de células-T ayudadoras foliculares (Tfhs) (Crotty, 2014, 2015_eBioscience, 2015).

En el modelo HPV16-ALIFE, se identifican las BCs maduras que no han ubicado una TC para establecer un vínculo. Las Th0s específicas de antígeno en la zona-T que fueron cebadas por DCs migran hacia el borde del folículo, donde se forma la interacción entre BCs y Th0s afines. El proceso de unión, al igual que los casos previos, implica activar marcadores de superficie y realizar los desplazamientos correspondientes. En este punto, se modifica el valor de estado a dos (2), representando la unión de las siguientes moléculas: BCR (BCs) ya viene unido al antígeno, MHC-II (BCs) se une a TCR (Th0s), y CD40 (BCs) se une a CD40L (Th0s). Se activan (estado=1) receptores CD287 (TLR7) y CD289 (TLR9). Las BCs podrán interactuar solo con Th0s que posean sus marcadores de superficie en estado dos (2), para luego realizar la migración correspondiente. En este punto se activan las citoquinas de acuerdo con las validaciones requeridas. El modelo verifica que si CXCR5 se encuentra expresado, las Th0s tempranas migran al borde del folículo y se da inicio al proceso de diferenciación a Tfh (ver paso 9). También, en esta etapa se da inicio al ciclo de proliferación de células-B específicas de antígeno (ver paso 9.6).

Paso 8. Diferenciar célula-T en fenotipo Tfh (día 2)

Pre-requisito: Célula-Th0s activas con marcadores de unión activados en zona interfolicular.

La diferenciación se habilita estando activas IL-6 e IL-21 (citoquinas de polarización) (Crotty, 2014; Martínez-Sánchez et al., 2015). La activación IL-6 y de STAT3 promueve apoptosis de células-T (Akdis et al., 2011). PD-1 es altamente expresado sobre células Tfhs (Pedoeem et al., 2014).

En el modelo HPV16-ALIFE, las células Th0s apropiadas migran a los folículos externos. Se valida que las citoquinas IL-6 e IL-21 en encuentren activas, que los marcadores de superficie se encuentren reportando unión, y que las Th0s se encuentren en la ubicación correcta. Si se cumplen estos requisitos se activa el fenotipo de células-T ayudadoras foliculares, se activan sus propias moléculas de superficie y se activan los receptores y citoquinas propias de este fenotipo. Se activan las moléculas diferenciadoras del fenotipo: BCL-6 y STAT3. Se activan las moléculas de superficie: CD28, CD40L, ICOS, CXCL13 y PD-1. Se activan las citoquinas: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-17F, IL-21, y los receptores: IL-5R, IL-6Ra, IL-2Ra, IL-21R, CD132 (cadena gamma). En esta etapa, se da inicio a la proliferación de células Tfh y se activa la apoptosis de células-Th0.

Paso 9. Activar otras interacciones dependientes de DCs

Pre-requisito: DCs activadas.

En esta etapa se realizan varias interacciones en simultánea, entre poblaciones de DCs activadas y poblaciones de células NK, Th1, Tregs y Th17, para lo cual el modelo valida las citoquinas de polarización y citoquinas de bloqueo, según sea el caso. Se procede a activar

las moléculas de diferenciación de la población en particular, así como también las moléculas de superficie y citoquinas secretadas en cada una de las poblaciones referidas. Posteriormente, se continúa con el proceso de proliferación de DCs.

Paso 9.1. Habilitar interacción entre DCs, Th0s y células NKs

Pre-requisito: Interacción DCs y Th0 cumplida (paso 4)

Para activar la población de células NK, deben encontrarse en estado activo las citoquinas IL-2, IL-12, IL-15/IL-15R (eBioscience, 2015; Romeee et al., 2014; Sim et al., 2014; Yoon et al., 2015). Las células NKs pueden promover la diferenciación indirecta de nuevas células-T a Th1 por la producción de IFN- γ (Mills, 2011). Las células NKs proporcionan respuestas rápidas ante células infectadas por virus, actuando tres (3) días después de la infección (Whiteside et al., 1990). IL-3 es expresada por células NK (Akdis et al., 2011; Shaikh, 2011). La secreción de IL-12 puede ser desencadenada por IL-15 e IFN- γ por células NKs (Yuzhalin et al., 2014). IL-13 induce la producción de IFN- γ por células NKs (eBioscience, 2015). Células NKs expresan LFA-1 en reposo, lo cual le permite la adhesión a un objetivo (Mace et al., 2014). PD-1 es expresado por células NKs (Pedoeem et al., 2014).

El modelo HPV16-ALIFE valida las citoquinas de polarización para la población de células NKs, que corresponde a: IL-2, IL-12, IL-15, IL15R e IL-18. Al activarse la población NKs se actualizan las moléculas de diferenciación: Tbet, Eomes; se activa el estado de los receptores: IL-2Ra, IL-12R, CXCR1; se activan las moléculas de superficie: NKG2, NKG2D, NKp30, NKp44, Nkp46, LFA-1, perforin, granzyme, GM-CSF y PD-1; y se activa la expresión de las citoquinas: IFN- γ , IL-17A, IL-22, TNF- α e IL-3. Así mismo, se verifica si el estado de cáncer se encuentra activo, caso en cual se bloquea la expresión de NKp30 y NKp46. En señal de unión se simulan los siguientes acoples: IL-12 (DCs) se une a IL-12R (NKs), IFN- γ (NKs) se une a IFN- γ R (Th0), y por ende se actualiza el valor de estado correspondiente.

Paso 9.2. Habilitar interacción entre DCs y Th1s activadas por TLRs

Pre-requisito: Interacción DCs y Th0 cumplida (paso 4)

La generación de IFN- α , IFN- β e IL-12, en respuesta a un patógeno intracelular (virus) estimula las células-T activas para inducir la expresión de T-bet, promoviendo la diferenciación a Th1 (Pennock et al., 2013). Además, la oncoproteína E6 de HPV16, bloquea la señalización STAT1 (Tummers et al., 2015).

El modelo HPV16-ALIFE valida las citoquinas de polarización para la población Th1, que corresponde a IFNs e IL-12. Al activarse la población Th1 se actualizan las moléculas de diferenciación: Tbet, STAT1 y STAT4; se activa el estado de los receptores TCR, IFN- γ R1, IL-12RB2, IL-18R; se activan las moléculas de superficie ICOS; se activa la expresión de las citoquinas: IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , y se activan las citoquinas de inhibición de otras poblaciones: IL-4. Así mismo, se verifica la expresión de la oncoproteína E6 por parte del virus, y de encontrarse activa se procede a bloquear STAT1. En señal de unión se simulan los siguientes acoples: IL-27 (Th1) se une a IL-27R, IFN- γ (Th1) se une a IFN- γ R (Th0), y por ende se actualiza el valor de estado correspondiente.

Paso 9.3. Habilitar interacción entre DCs y células Tregs

Pre-requisito: Interacción DCs y Th0 cumplida (paso 4)

El sistema inmune produce Tregs bajo la influencia de TGF- β (Pennock et al., 2013) e IL-10 (Mills, 2011). IL-2 favorece la expansión de Treg y la reducida señalización de IL-2R parece dañar su generación (Liston et al., 2014).

El modelo HPV16-ALIFE valida las citoquinas de polarización para la población Tregs, que corresponde a IL-2, IL-10 y TGF- β . Al activarse la población Treg se actualizan las moléculas de diferenciación: Foxp3 y STAT5; se activa el estado de los receptores TCR, IL-1R1, IL-1R2; se activan las moléculas de superficie: CTLA-4, OX40, 4-1BB; y la expresión de las citoquinas: IL-10, IL-35, TGF- β . En señal de unión se simulan los siguientes acoples: TGF- β (DCs) se une a CTLA-4 (Treg), y por ende se actualiza el valor de estado correspondiente.

Paso 9.4. Habilitar interacción entre DCs y células Th17s

Pre-requisito: Interacción DCs y Th0 cumplida (paso 4)

Cuando nuevas células-T reciben señales de TGF- β e IL-6, con estimulación sostenida de IL-21 e IL-23, se diferencian en células Th17 (Pennock et al., 2013). IL-1 β , IL-6, IL-18 e IL-23, promueven la diferenciación de Th17 (Mills, 2011). IL-1 β junto con IL-23 inducen la expresión de IL-17 (Akdis et al., 2011).

El modelo HPV16-ALIFE valida las citoquinas de polarización para la población Th17s, que corresponden a IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-23 y TGF- β . Al activarse la población Th17s se actualizan las moléculas de diferenciación: ROR γ t, STAT3; se activa el estado de los receptores TCR, IL-1R1, IL-12RB1, IL-13RA1, IL-17R, IL-23R; se activan las moléculas de superficie: ICOS; y la expresión de las citoquinas: IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-24, IL-26, TNF- α ; se activan las citoquinas de inhibición de otras poblaciones: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-27. En señal de unión se simulan los siguientes acoples: IL-1 (DCs) se une a IL-1R1 (Th17s), IL-17 (Th17s) se une a IL-17R (Th17s) (unión autocrina), IL-23 (DCs) se une a IL-23R (Th17s), y por ende se actualiza el valor de estado correspondiente.

Paso 9.5. Activar proliferación DCs

Pre-requisito: Interacción DCs y Th0 cumplida (paso 4)

Las células dendríticas plasmacitoides son relativamente de larga vida y son reemplazadas por DCs precursoras transmitidas por la sangre (Geissman et al., 2010). Bajo condiciones estables, las DCs tienen rápida tasa de rotación, con rangos entre 1.5 y 2.9 días (Kushwah et al., 2010) (que en el modelo equivalen a tres (3) rotaciones por semana). TNF- α promueve reacciones pro-inflamatorias mientras sobreexpone IL-10 en macrófagos y monocitos como una forma de retroalimentación negativa, terminando por lo tanto la respuesta inflamatoria (Lippitz, 2013). IL-23R es expresado por DCs (Akdis et al., 2011). IL-25 (IL-17E), suprime respuestas y desarrollo de Th17 mediante la inducción de IL-13 en DCs (eBioscience, 2015). LPS e IFN- γ pueden inducir IL-30 en DCs (Dimeo et al., 2014). DCs expresan IL-36R (Vigne et al., 2012). Se ha mostrado que IRF3 e IRF7 son constitutivamente expresados por pDCs (Bonjardim, 2005). La interacción CD40-CD40L (CD154) induce señales anti-apoptóticas en DC (Kushwah et al., 2010). Las DCs que reconocen virus a través de TLR7 y TLR9, regulan IRFs (Kushwah et al., 2011).

El modelo HPV16-ALIFE activa la proliferación de las células dendríticas de acuerdo con las tasas de rotación documentadas. Además, monitorea el estado de marcadores de superficie y expresión de citoquinas correspondiente a esta población celular, de acuerdo con la información referenciada previamente y ampliada en el libro anexo-1, capítulo I.

Paso 9.6. Activar proliferación células-B específicas de antígeno**Pre-requisito: Interacción DCs y Th0 cumplida (paso 4) e interacción entre células-B y células-T específicas de antígeno (paso 7)**

Células-B activadas migran a folículos externos, donde se someten a proliferación (Kurosaki et al., 2015). TGF- β tiene un efecto negativo sobre la proliferación y diferenciación de células-B (Lippitz, 2013).

El modelo HPV16-ALIFE activa la proliferación de células-B (BCs) específicas de antígeno, verificando previamente que TGF- β se encuentre inactivo. En caso de activarse el ciclo de proliferación, se producen dos (2) nuevas células hijas por cada BC específica de antígeno. Además, se monitorea el estado de marcadores de superficie y expresión de citoquinas correspondiente a esta población celular, de acuerdo con la información referenciada previamente y ampliada en el libro anexo-1, capítulo I.

Paso 10. Diferenciación células-B de corta vida.**Pre-requisito: Células-B activadas en el vecindario (día 3)**

Las células Tfh migran de la región interfolicular hacia el folículo. Algunas de las BCs activadas por antígeno que proliferan se diferencian en células plasma de corta vida (slPC), las cuales dan lugar a sitios extra foliculares. Otras se desarrollan en células-B de memoria independiente del centro germinal (GC) (mBCs), y alternativamente otras pueden retornar al folículo y pueden someterse a una rápida proliferación, para luego formar el centro germinal y participar de la reacción de centro germinal con la ayuda de células Tfh (De Silva et al., 2015; Kurosaki et al., 2015; Tarlinton, 2012). Las células-B de memoria expresan TLR7 y TLR9, y las células plasma expresan TLR8 y TLR9 (Isaza-Correa et al., 2014).

En el modelo HPV16-ALIFE, las BCs con marcas de unión que se encuentren en el vecindario pasan a la zona oscura, y entre las restantes BCs específicas de antígeno disponibles, se elige al azar una célula para ser diferenciada entre célula plasma de corta vida (slPC) o célula-B de memoria de corta vida (slmBC). En la generación de la población de células-plasma (PC) de corta vida, se activan las moléculas diferenciadoras (BLIMP1) y se activan moléculas de superficie: IgMlow, CD38++, CD138+, BCMA+, CD27+, BLIMP1, las cuales pueden secretar anticuerpos con afinidad moderada y sin cambios. Las células-B foliculares, precursoras GC, bajo la influencia de células Tfh, activan moléculas IgMlow, IgDhi, BAFF-R, CD21+, CD23+, CD269 (BMCA). Las células-B precursoras GC ingresan a la zona oscura del GC para proliferar vigorosamente y formar centros germinales.

Paso 11. Activar reacción de centro germinal (GC) de células Tfh y diferenciación de células-B de larga vida (días 4-7)**Pre-requisito: Fenotipo Tfh activo y células-B en centro germinal (gcBCs)**

Las células-B migran de la región interfolicular al centro del folículo, el cual se caracteriza por una red de células dendríticas foliculares (FDCs), las cuales comienzan a proliferar y, como resultado, empujan hacia afuera las células-B foliculares para formar el centro germinal temprano, el cual consta de blastos de células-B rodeados por la zona del manto. Esta estructura también es referida como el folículo secundario (De Silva et al., 2015). Las FDCs son una población única de células que son esenciales para una eficiente formación de centro germinal y para la producción de anticuerpos de alta afinidad. Están centralmente localizadas dentro de los folículos de células-B en los órganos linfoides secundarios (Heesters et al., 2014). Las FDCs activan la expresión de IL-15 (Park et al., 2004). También se producen algunas células-B de memoria independientes del GC, que mantienen un fenotipo de células-

B, pero que parecen epigenéticamente programadas para diferenciarse rápidamente entre células secretadoras de antígeno. Se cree que esta fase ha evolucionado para proporcionar protección efectiva contra una futura infección, y se cree que ocurre en paralelo con la fase extrafolicular. Entre los días cinco (5) y seis (6), el GC se expande rápidamente como resultado de la rápida proliferación de los blastos de células-B, activando la reacción FDCs y la selección de anticuerpos de alta afinidad. Sobre el día siete (7), las zonas oscura y clara se forman, lo cual resulta en el establecimiento del GC maduro (De Silva et al., 2015).

En esta etapa, el modelo HPV16-ALIFE muestra la población FDCs y activa la secreción de IL-15. Luego, valida la existencia de células-B en GC y la existencia de FDCs en el vecindario. Células-B activadas por antígeno, precursoras GC forman el GC temprano desde el día cuatro (4), donde se diferencian entre blastos y en los días siguientes se somete a expansión clonal hasta que el GC madura, el cual se caracteriza por formar la zona clara y zona oscura en el día siete (7), procesos que se detallan a continuación (pasos 11.1 y 11.2). Mientras proliferan, el proceso de hipermutación somática (SHM) introduce cambios de pares de bases generando cambios de isotipos (paso 11.3).

Paso 11.1. Activar proceso zona oscura (día 7)

Pre-requisito: Población células-B en centro germinal (gcBCs) activas en el vecindario

La zona oscura consta principalmente de blastos de células-B empaquetadas (De Silva et al., 2015). En la zona oscura del GC, la expansión clonal de células-B específicas de antígeno está acompañada por la diversificación del receptor BCR a través de la hipermutación somática (SHM) (Kurosaki et al., 2015). Durante la proliferación, el proceso SHM introduce cambios de pares de bases entre la región V(D)J, del reordenamiento de la región variable de genes inmunoglobulina; algunas de estas mutaciones conducen al cambio de secuencia de aminoácidos. El proceso SHM, principalmente aleatorio, produce clones de células-B de centro germinal (gcBCs) mutantes que tienen un amplio rango de afinidades para inmunización de antígenos. Luego las gcBCs de zona oscura inician el tránsito hacia la zona clara (De Silva et al., 2015; Kurosaki et al., 2015). Los marcadores moleculares de gcBCs en zona oscura son: CXCR4hi, CD83low, CD86low (De Silva et al., 2015).

En el modelo HPV16-ALIFE, se genera la rápida proliferación de gcBCs dentro de la zona oscura y se activan los marcadores moleculares que las identifican. Se activa el proceso de hipermutación somática (SHM), para luego diversificar el reordenamiento de genes. Como SHM es un proceso aleatorio, el modelo controla la maduración de afinidad generando un número aleatorio, cuya selección puede generar: opción = 0, antígeno de baja afinidad; opción = 1, antígeno de mediana afinidad; opción = 2, antígeno de alta afinidad. Posteriormente, se activa el proceso de recirculación hacia zona clara.

Paso 11.2. Activar proceso zona clara (días 5-6)

Pre-requisito: Población Tfh y FDCs activas en el vecindario.

La zona clara consta principalmente de células Tfh y FDCs (De Silva et al., 2015). Las células-B que salen del ciclo celular se relocalizan en la zona clara, donde BCR de gcBCs de zona clara, con la ayuda de células inmunes, incluyendo célula Tfh y FDCs, son seleccionadas para mejorar la unión al antígeno. La selección de afinidad tiene lugar a través de la interacción con complejos inmunes revestidos de células dendríticas foliculares (FDCs) y células-T ayudadoras foliculares (Tfh) específicas de antígeno (De Silva et al., 2015; Kurosaki et al., 2015).

En zona clara, pueden presentarse los siguientes tres (3) procesos: Proceso-1. Entre las gcBCs de zona clara nuevamente generadas que expresan mutantes BCR resultantes de la SHM en la zona oscura, BCR de alta afinidad está directamente asociado con mayor captura de antígenos y conduce a una mayor densidad de complejos péptido-MHC presentados en la superficie de células-B. Esto se traduce en la mayor parte de la ayuda de células-T, lo cual a su turno conduce a selección positiva. Proceso-2. Luego de la selección positiva, un subgrupo de gcBCs de zona clara es instruido para recircular hacia la zona oscura. Proceso-3. Células gcBCs en zona clara nuevamente generadas, que producen un anticuerpo desfavorable, son incapaces de entregarse para capturar suficiente antígeno y por ello se someten a apoptosis (De Silva et al., 2015).

En esta etapa, el modelo HPV16-ALIFE verifica el valor del número aleatorio generado en el paso previo. Si la afinidad de células-B GC (gcBCs) en zona clara (LZ) tiene baja afinidad, se activa el proceso de apoptosis (Proceso-3). Si la afinidad de gcBCs en LZ tiene media afinidad, ingresará al proceso de recirculación en zona oscura (DZ) (Proceso-2). Si la afinidad de gcBCs LZ reporta alta afinidad, se activa el complejo péptido-MHCII presentado sobre la superficie de la célula-B LZ y se activa la interacción entre célula-B LZ y Tfh. Bajo esta interacción se activa la co-expresión de citoquinas IL-4 e IL-21, y se activa la unión de las siguientes moléculas: péptido-MHCII (gcBCs LZ) se une a TCR (Tfh GC), ICOSL (gcBCs LZ) se une a ICOS (Tfh GC), CD40 (gcBCs LZ) se une a CD40L (Tfh GC).

Si resulta baja afinidad (0), se activa el proceso denominado “proceso-baja-afinidad” que corresponde al Proceso-3 previamente detallado; si resulta media afinidad (1), se activa el proceso denominado “proceso-media-afinidad” que corresponde al Proceso-2; y si resulta alta afinidad (2), se activa el proceso denominado “proceso-alta-afinidad” que corresponde al Proceso-1, previamente detallados.

Paso 11.2.1. Activar proceso-baja-afinidad en zona clara (días 5-6)

El modelo HPV16-ALIFE, selecciona las gcBCs de baja afinidad y las somete a apoptosis.

Paso 11.2.2. Activar proceso-media-afinidad en zona clara (días 5-6)

El modelo HPV16-ALIFE, selecciona las gcBCs de media afinidad y las mueve a la zona oscura del GC.

Paso 11.2.3. Activar proceso-alta-afinidad en zona clara (día 7)

Las células-B pueden someterse a la recombinación de cambio de clase (CSR) antes de la recirculación de zona oscura, mientras que otras células cambian y se diferencian directamente. Antes en la zona oscura, estas células se habían sometido a SHM, generando potencialmente anticuerpos mutantes con una afinidad mejorada. La recirculación entre la zona oscura y la zona clara facilita varias rondas de mutación y selección, y dentro de un corto tiempo, conduce a la generación de células-B de memoria y células plasma de alta afinidad (De Silva et al., 2015).

El modelo HPV16-ALIFE, selecciona las gcBCs de alta afinidad las cuales interactúan con la población de células Tfh. En esta interacción se activa la expresión de IL-12 la cual es producida a través de la coincidencia entre CD40 y CD40L (Akdis et al., 2011) y se actualizan las moléculas de superficie con los valores que representan la unión. Posteriormente, luego de validar la ubicación y el grado de afinidad, se genera al azar la opción para activar el proceso de recombinación de cambio de clase (CSR) (ver paso 11.3) o la generación del

proceso de diferenciación gcBCs específicas de antígeno de larga vida (ver paso 11.4), los cuales se explican a continuación. Posteriormente, se decide de forma aleatoria, el tipo de salida de la célula Tfh del GC, considerando que las células Tfh están activas por el tiempo de duración de GCs con exposición continua ante el antígeno, lo cual frecuentemente tarda sesenta (60) días o más (Crotty, 2014), lo que significa que la salida de Tfh no ocurre antes de sesenta (60) días. Las posibles opciones a generar son: opción=0, Tfh ingresa a un GC diferente; opción=1, Tfh sale al folículo de célula-B adyacente y luego reingresa al mismo GC; opción=3, Tfh sale del GC, desregula Bcl6 y se desarrolla como Tfh de memoria. En este último caso, puede sobreregular IL-7R α y desarrollarse como células Tfh de memoria en reposo, caso en el cual PD-1 se expresa en bajo nivel.

Paso 11.3. Activar proceso recombinación cambio de clase (CSR) (día 7)

Pre-requisito: Unión de alta afinidad entre poblaciones gcBCs y Tfh proliferando en el vecindario

Recombinación de cambio de clase (CSR), es un proceso por el cual células-B cambian su isotipo inmunoglobulina para generar anticuerpos con diferentes funciones efectoras. Para lograrlo, células-B proliferando reordenan su DNA para cambiar a partir de la expresión IgM (u otra clase de inmunoglobulina), para expresar una inmunoglobulina de región constante cadena pesada, produciendo de esta forma anticuerpos con funciones efectoras diferentes. Se ha observado que los cambios en la clase de anticuerpos están íntimamente vinculados a la cantidad de células-B generadas en humanos. La frecuencia CSR por cada generación puede ser independiente de citoquinas, como es el caso con LPS, o puede ser conducida por citoquinas tales como IL-4, TGF- β o IFN- γ . Las concentraciones de citoquinas influyen fuertemente sobre el vínculo entre CSR y la división celular, y con bajas concentraciones conduce a un mayor número de divisiones celulares antes que ocurra CSR (De Silva et al., 2015; Nutt et al., 2015). IL-4 determina el cambio de isotipo hacia IgG4. IL-10 mejora el cambio de isotipo, incrementando la producción de IgG4 (Akdis et al., 2011).

El modelo HPV16-ALIFE, selecciona las gcBCs luego de su unión con Tfh de alta afinidad. En caso de no estar activas las TLRs, se genera de forma aleatoria el cambio, entre isotipos "A", "G" y "E". En caso de ser generado el isotipo "G", se verifica la expresión de IL-4 e IL-10, y en caso de encontrarse activas, se privilegia el isotipo "G4". En caso de darse algún estímulo por TLRs, el cambio de isotipo se verá afectado, según lo expuesto en el microambiente TLRs (numeral 3.1.6.3.2). Realizado el cambio de isotipo, se produce la recirculación hacia la zona oscura del GC.

Paso 11.4. Activar proceso de diferenciación gcBCs específicas de antígeno de larga vida (día 7)

Pre-requisito: Unión de alta afinidad entre poblaciones gcBCs y Tfh proliferando en el vecindario

Células-B de zona clara seleccionadas por antígeno eventualmente se diferencian entre células precursoras de células-B de memoria y plasmoblastos, los cuales son precursores de células plasma (De Silva et al., 2015). BLIMP1 se requiere para diferenciar células plasma y BCL6 para proliferar (Tarlinton, 2012). Células-B de memoria expresan TLR7 y TLR9, y células plasma expresan TLR8 y TLR9 (Isaza-Correa et al., 2014).

El modelo HPV16-ALIFE, selecciona gcBCs que se han unido previamente a Tfh con alta afinidad, para generar el proceso de diferenciación entre células plasma y células-B de memoria de larga vida, para lo cual se activa un proceso de proliferación de gcBCs LZ de alta

afinidad que produce célula-B precursora de memoria y célula-B precursora plasma de larga vida. Al generarse células de memoria de larga vida, se activan las moléculas diferenciadoras y de superficie: CD19+, CD20+, CD23low, CD27+, CD38-, CD40+, CD150-, IgA+, IgG+. De igual forma, al generarse células plasma de larga vida, se activan las moléculas diferenciadoras y de superficie: CD9hi, CD19low, CD20-, CD27hi, CD31HI, CD38hi, CD40+, CD95+, CXCR4+. Además, se activan los receptores TLR7, TLR8 y TLR9, según la población y se incrementa el número de divisiones correspondiente.

Paso 12. Activar secreción anticuerpos

Pre-requisito: Células plasma de corta vida (sIPCs) y de larga vida (IIPCs) activas

Las células plasma de corta vida podrán generar anticuerpos durante un tiempo de cinco (5) días (Bortnick et al., 2013). Los tiempos medios de vida de los anticuerpos de corta vida reportan los siguientes estimados: IgA cinco y medio (5.5) días; IgM, entre cinco (5) y diez (10) días; e IgG, veintitrés (23) días. Las células plasma de larga vida secretan altos niveles de anticuerpos, que van desde cientos a miles de anticuerpos por segundo por célula. Los anticuerpos de larga vida podrán generar anticuerpos por un tiempo de treinta (30) días sin vacunación y con vacunación hasta ciento veinte (120) días (eBioscience, 2015).

El modelo HPV16-ALIFE, verifica que exista una población de células plasma de corta vida (sIPCs) y una población de células plasma de larga vida (IIPCs), se procede a generar sus correspondientes anticuerpos, teniendo en consideración su tiempo medio de vida, tiempo durante el cual proliferan. Cumplido el tiempo medio de su vida, el modelo procede a eliminarlos.

Paso 13. Activar proliferación de nuevas células-B

Pre-requisito: Células-B precursoras

Las células-B responden a señales del microambiente proporcionadas por antígenos, y las células-T, mediante factores distribuidos asimétricamente y receptores que posteriormente pueden regular la diferenciación de las células hijas (Tarlinton, 2012). Las células-B migran a folículos externos, donde se someten a proliferación (Kurosaki et al., 2015). TGF- β tiene un efecto negativo sobre la proliferación y diferenciación de células-B (Lippitz, 2013). Nuevas células-B proliferan entre veinte (20) y treinta (30) horas después de las células-B de memoria y estas últimas exhiben mayor proliferación que nuevas células-B. Las nuevas células-B permanecen sin dividirse por setenta y dos (72) horas. Después de este tiempo, una pequeña proporción de nuevas células-B estimuladas por CD40L entran a división, alcanzando un máximo de veinte por ciento (20%) del total. IL-10 incrementa la proporción de nuevas células-B dividiéndose en todo momento hasta un máximo de sesenta y cinco por ciento (65%) después de cien (100) horas (Tangye et al., 2003).

El modelo HPV16-ALIFE, genera nuevas células-B, teniendo en cuenta los tiempos de activación referidos. Considerando que esta población se encuentra en reposo, los estados de los marcadores de superficie reportan estado inactivo (igual a cero (0)).

Paso 14. Activar diferenciación de nuevas células-T

Pre-requisito: Células-T precursoras

Las células-T se diferencian entre células-T efectoras (T-CD4+) (Ths) o células-T citotóxicas (CTLs) (T-CD8+). Durante las primeras veinticuatro (24) horas de estimulación, T-CD4+ y TCD8+, se preparan para expansión clonal y se incrementan en tamaño, pero no se observa división (Kaeche et al., 2002). IL-2 es producida por nuevas células-T CD8+ (Lippitz, 2013) y el

receptor IL-36R es expresado predominantemente por nuevas células-T CD4+ (Vigne et al., 2012).

El modelo HPV16-ALIFE, genera nuevas células-T CD4+ y CD8+, considerando las referencias previas, controlando el número de divisiones y activando la expresión de las citoquinas referidas.

Paso 15. Activar interacción entre DCs y población de células-T CD4+

Pre-requisito: Poblaciones de células DC y TCD4+ activas

Las células-T CD4+ encuentran antígenos específicos del patógeno presentados sobre células presentadoras de antígeno (APCs) MHC clase II, y producen citoquinas efectoras apropiadas para la infección (Pennock et al., 2013). IL-2 es producida por T-CD4+ y DCs activadas (Lippitz, 2013).

El modelo HPV16-ALIFE, ubica DCs disponibles y aptas para unirse a células-T CD4+. Si la unión se realiza: pMHC-II se une a TCR, CD80/CD86 se une a CD28, y se actualizan los marcadores, denotando que el encuentro tuvo efecto. Adicionalmente, se activa la expresión de las citoquinas referidas.

Paso 16. Activar interacción entre DCs y población de células-T CD8+

Pre-requisito: Poblaciones de células DC y TCD8+ activas

Las células del tejido infectadas con patógenos intracelulares presentan antígenos específicos del patógeno en su molécula MHC clase I por células-T CD8+, las cuales lisan las células infectadas y también producen citoquinas efectoras adicionales (Pennock et al., 2013). Células-T CD8+ activadas producen IFN- γ después de la estimulación con el antígeno (Lippitz, 2013).

El modelo HPV16-ALIFE, ubica DCs disponibles en el vecindario y aptas para unirse a células-T CD8+. Si la unión se realiza: pMHC-I se une a TCR, CD80/CD86 se une a CD28, y se actualizan los marcadores, denotando que el encuentro tuvo efecto. Adicionalmente, se activa la expresión de las citoquinas referidas.

Paso 17. Activar proliferación población células-T

Pre-requisito: Poblaciones de células-T progenitoras activas.

Nuevas células-T CD4+ (Th0) son activadas cuando ellas reconocen un antígeno en un órgano linfático secundario (Martínez-Sánchez, 2015). Nuevas células-T requieren señales activas, que incluyen principalmente TCR/MHC e IL-7, para sobrevivir y para someterse a proliferación homeostática (Zhan et al., 2005). Una vez la segunda señal de activación se completa, Th0 prolifera por sí misma. IL-2 puede afectar el programa de división de células-T CD4+ y CD8+. La proliferación se incrementa o disminuye por la presencia o ausencia de IL-2, respectivamente (Kaeck et al., 2002). Células-T CD8+ proliferan en respuesta a IL-15, mientras que células-T CD4+ no lo hacen (Kaeck et al., 2002; Zhang et al., 2005).

El modelo HPV16-ALIFE, verifica el microambiente validando la expresión o no de IL-2, IL-15 e IL-7. De encontrarse activa la secreción de IL-2 e IL-15, se generan los procesos de proliferación de células-T CD4+. En caso de encontrarse activa IL-2 pero no IL-15, se generan los procesos de proliferación de células-T CD8+. Además, si la expresión de IL-7 se encuentra activa, se genera la proliferación de células-T progenitoras.

Paso 17.1. Activar proliferación población células-T CD8+**Pre-requisito: Población células-T CD8+ activas**

Comienza la división de células-T CD8+ en una tasa rápida (seis (6) a ocho (8) horas por división celular) (Kaeche et al., 2002; Zhang et al., 2005). Con mínimo contacto antígeno, células T-CD8+ pueden dividirse de siete (7) a diez (10) veces. Se estima que en infección aguda por virus, se dividen entre quince (15) y veinte (20) veces. En infección viral aguda, la cantidad pico de estas células se alcanza en dos (2) a tres (3) días después que el patógeno infeccioso es despejado (Kaeche et al., 2002). Células-T CD8+ específicas de antígeno pueden amplificarse más de 1,000 veces en unos pocos días (Zhang et al., 2005). La expresión de citoquinas IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15, sobreregularan respuestas de sobrevida de este tipo de células. Después de la estimulación del antígeno, células-T CD8+ producen IFN- γ (Lippitz, 2013). TGF- β es un fuerte antagonista de la producción de IFN- γ en células-T CD8+ y en células NK (Shaikh, 2011; Lippitz, 2013). IL-2 es producida por nuevas células-T CD8+ (Akdiss et al., 2011; Sim et al., 2014a).

El modelo HPV16-ALIFE, verifica la existencia de la población de células-T CD8+ específica de antígeno en estado activo, para proliferar a partir de ésta, considerando el número de divisiones según el momento en que se genera la división. Se activa la expresión de las citoquinas IL-2 e IFN- γ , y también del receptor IL-2Ra. Adicionalmente, se verifica el estado de TGF- β , perforin y granzyme.

Paso 17.2. Activar proliferación población células-T CD4+**Pre-requisito: Población células-T CD4+ activas**

Células-T CD4+ tienen una tasa de división más lenta que células-T CD8+, se demora un poco más, entre treinta y seis (36) y cuarenta y ocho (48) horas después del estímulo inicial y luego se presenta en una tasa mucho menor (aproximadamente diez (10) horas) por división celular. Después de las cuarenta y ocho (48) horas, una gran proporción de células-T CD4+ no desarrolla propiedades efectoras, es decir que no se polarizan. Células-T CD4+ no polarizadas producen IL-2 pero no IFN- γ (Th1) ni IL-4 (Th2). Células-T CD4+ expuestas al antígeno pueden dividirse aproximadamente siete (7) veces. Se estima que en infección aguda pueden dividirse nueve (9) veces. La expresión de citoquinas IL-2, IL-4 e IL-7, pero no IL-15, sobreregularan las respuestas de sobrevida de células-T CD4+ (Kaeche et al., 2002). La sobrevida y proliferación homeostática de células-T CD4+, depende de la señal IL-7 y también requiere la interacción entre TCR/MHC-II (Zhang et al., 2005). IL-21 es principalmente producida por células-T CD4+, Tfh's y NKT (Sim et al., 2014).

El modelo HPV16-ALIFE, verifica la existencia de la población de células-T CD4+ específicas de antígeno en estado activo, para proliferar a partir de ésta, considerando el número de divisiones según el momento en que se genera la división, de acuerdo con lo expuesto previamente. Se activa la expresión de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-21 e IFN- γ , y de los receptores IL-2Ra y CD132. Adicionalmente, se incrementa la cantidad de divisiones que la célula progenitora ha tenido.

Paso 17.3. Activar proliferación población células-T progenitoras**Pre-requisito: Población células-T progenitoras activas**

Una vez que la segunda señal de activación está completa, estas células pueden proliferar por sí mismas, lo cual se logra mediante la liberación de IL-2 que actúa sobre sí misma en forma autocrina. El promedio de células-T que responden ante la presencia de máxima co-estimulación CD28 es de 15.3 eventos mitóticos (Wells et al., 1997). La combinación de IL-12

e IL-18, incrementa la producción de IFN- γ en células-T (Akdis et al., 2011; Lippitz, 2013; Thomas et al., 2003). Citoquinas IL-18 junto con IL-2, inducen la producción de IL-13 en células-T (Akdis et al., 2011).

El modelo HPV16-ALIFE, verifica la existencia de la población de células-T progenitoras activas en el vecindario, y a partir de ellas se activa el proceso de proliferación, controlando el máximo de eventos mitóticos posibles referidos, luego de lo cual se programa la muerte celular. Se verifica la coincidencia de expresión de las citoquinas IL-2, IL-12 e IL-18, en un estado activo para poder dar paso a la expresión de las citoquinas referidas. También, se activan los receptores; IL-2Ra, IL-4Ra, IL-12Rb1, IL-12Rb2, IL-18R, IFN- γ R1, IFN- γ R2.

Paso 18. Activar diferenciación población células-T CD8+

Pre-requisito: Poblaciones de células-T CD8+ activas.

Nuevas células-T CD8+ se programan para expandirse clonalmente y diferenciarse después de breves encuentros (entre dos (2) y veinticuatro (24) horas) con antígenos. En infección viral aguda, la cantidad pico de células-T CD8+ se alcanza en dos (2) a tres (3) días después que el patógeno infeccioso es despejado. En CTLs el pico se alcanza antes y con un máximo menor (Kaech et al., 2002). Citoquinas IL-2, IL-12, T-bet y Blimp-1, conducen a la producción de CTLs durante las fases tempranas de la respuesta inmune. Citoquinas IL-21, Eomes y Bcl-6, favorecen el desarrollo de células-T de memoria de larga vida (Penock et al., 2013). CTLs secretan IFN- γ , TNF e IL-2, para eliminar células infectadas. Células-T CD8 de memoria secretan IL-7 e IL-15 (eBioscience 2015; Kaech et al., 2002,). Cuando las células-T CD8 reconocen sus antígenos en la presencia de IFN- α , IFN- β e IL-12, se diferencian entre CTLs y generan grandes cantidades de IFN- γ y TNF- α (eBioscience, 2015; Pennock et al., 2013). Después de una infección aguda, las células-T CD8+ de memoria son mantenidas en una forma independiente de antígeno, principalmente dependiente de citoquinas, a través de las acciones de IL-7 e IL-15, las cuales promueven la sobrevivencia de células-T CD8+ de memoria y su auto-renovación a través de proliferación homeostática (Kaech et al., 2012).

El modelo HPV16-ALIFE, verifica el estado de las citoquinas y factores que marcan el proceso de diferenciación de cada población en las que puede diferenciarse las células-T CD8+. Si resultado de la verificación, las citoquinas IL-2, IL-12 y factores de transcripción T-bet y Blimp1, se encuentran en estado activo, se procede a la habilitación del proceso de diferenciación de CTLs. Si el resultado de la verificación de citoquinas IL-21 y factores de transcripción Eomes y Bcl-6, se encuentran en estado activo, se procede a la habilitación del proceso de diferenciación de células-T CD8+ de memoria. Al diferenciarse en población CTLs, se activa la expresión de los marcadores diferenciadores de esta población, como son Eomes y T-bet. Además, se activan los receptores TCR, FasL, perforin y granzyme, citoquinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , TNF- β . Al diferenciarse en población de células-T CD8 de memoria, se activa la expresión de citoquinas IL-7, IL-15, y se activan los receptores TCR, Fas, IL-23R.

Paso 19. Activar diferenciación poblaciones de células-T activas

Pre-requisito: Poblaciones de células-T CD4+ activas.

Las células-T CD4+, también conocidas como células-T ayudadoras, se diferencian en varios tipos de células dependiendo de las señales del microambiente y desafíos inmunológicos a los que se enfrenta. Una vez estas células se encuentran comprometidas con un destino en particular, pueden cambiar a diferentes tipos de célula, dependiendo del medio de citoquinas y otras señales del microambiente, aunque aún no se tiene un completo entendimiento de los mecanismos dinámicos que someten a las células-T CD4 a diferenciación y plasticidad. Cada

tipo de célula-T CD4+ está asociada con citoquinas, receptores, factores de transcripción y funciones específicas (Abou-Jaoudé et al., 2015; Martínez-Sánchez et al., 2015; Nakayamada et al., 2012). La diferenciación y plasticidad de células-T CD4+, dependen de las interacciones entre las citoquinas producidas por otras células inmunes, células epiteliales, adipocitos, o por las mismas células-T CD4+. Las células-T CD4+ con alta plasticidad, cambian de un tipo a otro, en respuesta a los desafíos del microambiente (Martínez-Sánchez et al., 2015). Información más detallada es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I.

El modelo HPV16-ALIFE, evalúa las condiciones de unión y expresión de citoquinas del microambiente, y según cada caso, habilita los procesos de diferenciación de células Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg, y Tfh, las cuales se explican a continuación.

Paso 19.1. Activar diferenciación población células Th1

Pre-requisito: Poblaciones Th0 y variables de ambiente específicos activos

Células Th1 expresan T-bet, secretan IFN- γ y están asociadas con inmunidad celular (Martínez-Sánchez et al., 2015). Las citoquinas de polarización para esta población son IL-12, IFN- γ e IL-27. Además, IL-4 e IL-10 activas, bloquean la diferenciación de Th1 (eBioscience, 2015; Martínez-Sánchez et al., 2015). Las acciones secuenciales de STAT1 inducidas por IFN- γ y STAT4 inducida por IL-12, promueven la expresión de T-bet, factor de transcripción fundamental para la programación Th1 (Basu et al., 2013). Las células que se han dividido más de cuatro (4) veces en condiciones de polarización Th1 podría no revertirse al fenotipo Th2, pero células que se han dividido menos veces sí podrían hacerlo (Kaech et al., 2002). IL-6 media la inducción de IL-21 en células Th1 (Akdis et al., 2011). La proteína E6 de HPV16 bloquea la señalización STAT1 (Tummers et al., 2015). Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I y en el libro anexo-2, capítulo III.

El modelo HPV16-ALIFE, evalúa las condiciones de unión y expresión de citoquinas del microambiente. La diferenciación de células-T CD4+ específica de antígeno hacia el fenotipo Th1, verifica inicialmente el estado de las citoquinas IL-4 e IL-10. Si estas citoquinas se encuentran activas, el proceso de diferenciación Th1 no tiene efecto. Si ocurre lo contrario, se verifica que las citoquinas diferenciadoras del fenotipo Th1 se encuentren activas. Si esta condición se cumple, se habilita el proceso de diferenciación de la población Th1, para lo cual se activan las moléculas diferenciadoras tales como T-bet, STAT1 y STAT4; se activan moléculas de superficie y receptores ICOS, TCR, IFN- γ R1, IFN- γ R2, IL-12Rb1, IL-12Rb2, IL-18R, IL-27R, TNF-R1; y las citoquinas IL-2, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TNF- β . De encontrarse activa la expresión de IL-6, se activa IL-21. Si se encuentra activa la expresión de la proteína viral E6, se bloquea la expresión de STAT1.

Paso 19.2. Activar diferenciación población células Th2

Pre-requisito: Poblaciones Th0 y variables de ambiente específicos activos

La diferenciación de células Th2 es inducida por STAT6 corriente abajo de la señalización de IL-4, la cual sobrerregula Gata3, regulador maestro de la programación Th2 (Basu et al., 2013). Células Th2 expresan Gata3, secretan IL-4 y están asociadas con inmunidad por parásitos (Martínez-Sánchez et al., 2015). Citoquinas IFN- γ y TNF- β activas, bloquean la diferenciación Th2. Las citoquinas de polarización de esta población son IL-4 e IL-25 (eBioscience, 2015). La citoquina IL-4 induciendo Th2, así como también IL-10 y TGF- β , se consideran reguladores negativos de IFN- γ (Akdis et al., 2011; Lippitz, 2013; Thomas et al., 2003). IL-10 es un inhibidor de la producción de IL-2 en células Th2 (Lippitz, 2013).

Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I y en el libro anexo-2, capítulo III.

El modelo HPV16-ALIFE, evalúa las condiciones de unión y expresión de citoquinas del microambiente. La diferenciación de células-T CD4+ específica de antígeno hacia el fenotipo Th2, verifica inicialmente el estado de las citoquinas IFN- γ y TNF- β . Si estas citoquinas se encuentran activas, el proceso de diferenciación Th2 no tiene efecto. Si ocurre lo contrario, se verifica que las citoquinas diferenciadoras del fenotipo Th2 se encuentren activas. Si esta condición se cumple, se habilita el proceso de diferenciación de la población Th2, para lo cual se activan las moléculas diferenciadoras tales como Gata3 y STAT6; se activan moléculas de superficie y receptores ICOS, TCR, IL-4Ra, IL-10R1, IL-10R2, IL-12RB2, IL-17Rb, IL-18R, IFN- γ R1, IFN- γ R2, IL-33Ra; y las citoquinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-21, IL-25, IL31. Además, se bloquean las citoquinas IFN- γ , IL-12, IL-23 e IL-2.

Paso 19.3. Activar diferenciación población células Th9

Pre-requisito: Poblaciones Th0 y variables de ambiente específicos activos

Células Th9 secretan IL-9 y ejercen actividad anticáncer (Martínez-Sánchez et al., 2015). Citoquinas IFN- γ e IL-27 activas, bloquean la diferenciación Th9. Citoquinas de polarización son IL-6, TGF- β e IL-21 (eBioscience, 2015). El receptor IL-17Rb es sobrerregulado en células Th9 (Akdis et al., 2011). Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo - capítulo I.

El modelo HPV16-ALIFE, evalúa las condiciones de unión y expresión de citoquinas del microambiente. La diferenciación de células-T CD4+ específica de antígeno hacia el fenotipo Th9, verifica inicialmente el estado de las citoquinas IFN- γ e IL-27. Si estas citoquinas se encuentran activas, el proceso de diferenciación Th9 no tiene efecto. Si ocurre lo contrario, se verifica que las citoquinas diferenciadoras del fenotipo Th9 se encuentren activas. Si esta condición se cumple, se habilita el proceso de diferenciación de la población Th9, para lo cual se activan moléculas de superficie y receptores TCR, IL-4Ra, IL-17Rb, TGF- β R2; y las citoquinas IL-9, IL-10. Además, se bloquean Foxp3, ROR γ t, y T-bet.

Paso 19.4. Activar diferenciación población células Th17

Pre-requisito: Poblaciones Th0 y variables de ambiente específicos activos

Las células Th17 orquestan el despeje de bacterias y hongos extracelulares, induciendo indirectamente y activando neutrófilos a través de la producción de citoquinas IL-17A e IL-17F. Estas células también pueden promover el cambio de clase de células-B hacia anticuerpos con isotipo IgG (Basu et al., 2013). Células Th17 expresan ROR α y ROR γ t, secretan IL-17 e IL-21, y están asociadas con activación de neutrófilos (Martínez-Sánchez et al., 2015). Citoquinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-27 en estado activo, bloquean la diferenciación de células Th17. Las citoquinas de polarización de esta población son IL-6, TGF- β e IL-21 (eBioscience, 2015). La activación de IL-6 y STAT3, promueven apoptosis de células-T. IL-23 en sinergia con TGF- β , ayuda a la expresión de IL-17 (Akdis et al., 2011). El desarrollo de Th17 es potencialmente inhibido por citoquinas IFN- γ e IL-4 (Basu et al., 2013). Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I.

El modelo HPV16-ALIFE, evalúa las condiciones de unión y expresión de citoquinas del microambiente. La diferenciación de células-T CD4+ específica de antígeno hacia el fenotipo Th17, verifica inicialmente el estado de las citoquinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-27. Si estas citoquinas se encuentran activas, el proceso de diferenciación Th17 no tiene efecto. Si ocurre

lo contrario, se verifica que las citoquinas diferenciadoras del fenotipo Th2 se encuentren activas. Si esta condición se cumple, se habilita el proceso de diferenciación de la población Th17, para lo cual se activan las moléculas diferenciadoras tales como ROR γ t y STAT3; se activan moléculas de superficie y receptores ICOS, TCR, IL-1R1, IL-6Ra, IL-7R, IL-12Rb1, IL-13-Ra1, IL-21R, IL-23R; y las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-24, IL-26, TNF- α , GM-CSF. Además, se bloquean las citoquinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-27.

Paso 19.5. Activar diferenciación población células Th22

Pre-requisito: Poblaciones Th0 y variables de ambiente específicos activos

Las células Th22 son diferenciadas de una forma dependiente de IL-6 (Basu et al., 2012). Las citoquinas de polarización de esta población son IL-6, TGF- β e IL-21 (eBioscience, 2015). Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I.

El modelo HPV16-ALIFE, evalúa las condiciones de unión y expresión de citoquinas del microambiente. La diferenciación de células-T CD4 $^{+}$ específicas de antígeno hacia el fenotipo Th22, verifica inicialmente que las citoquinas diferenciadoras del fenotipo Th22 se encuentren activas. Si esta condición se cumple, se habilita el proceso de diferenciación de la población Th22, para lo cual se activan moléculas de superficie y receptores TCR, IL-6Ra, IL-21R, IL-23R, TGF- β 2; y las citoquinas IL-10, IL-13, IL-21, IL-22, IL-26, TNF- α .

Paso 19.6. Activar diferenciación población células Treg

Pre-requisito: Poblaciones Th0 y variables de ambiente específicos activos

Células-T reguladoras (Treg) expresan Foxp3, secretan TGF- β y/o IL-10, y están asociadas con tolerancia inmune (Martínez-Sánchez et al., 2015). Además, suprimen el desarrollo de respuestas de células-T efectoras y parecen promover el cambio de clase de células-B hacia anticuerpos con isotipo IgA en tejidos mucosales (Basu et al., 2013). La citoquina de polarización de esta población es TGF- β (eBioscience, 2015). IL-6 suprime la generación de células Treg (Lippitz, 2013; Yuzhalin et al., 2014). IL-27 suprime la diferenciación de Treg a través de la vía STAT3, dado que desregula IL-2 (Yuzhalin et al., 2014). PD-1 y PD-L1 son altamente expresados sobre Treg (Pedoeem et al., 2014). Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I y en el libro anexo-2, capítulo III.

El modelo HPV16-ALIFE, evalúa las condiciones de unión y expresión de citoquinas del microambiente. La diferenciación de células-T CD4 $^{+}$ específica de antígeno hacia el fenotipo Treg, verifica inicialmente el estado de la citoquina IL-6. Si esta citoquina se encuentra activa, el proceso de diferenciación Treg no tiene efecto. Si ocurre lo contrario, se verifica que las citoquinas diferenciadoras del fenotipo Treg se encuentren activas. Si esta condición se cumple, se habilita el proceso de diferenciación de la población Treg, para lo cual se activan las moléculas diferenciadoras tales como FOXP3 y STAT5; se activan moléculas de superficie y receptores CTLA4, OX40, 4-1BB, TCR, IL-1R1, IL1R2, IL-2Ra, PD-1, PD-L1; y las citoquinas IL-10, IL-35, TGF- β .

Paso 19.7. Activar diferenciación población células Tfh

Pre-requisito: Poblaciones Th0 y variables de ambiente específicos activos

Células-T ayudadoras foliculares (Tfh) expresan Bcl6 y CXCR5, secretan IL-21 y están asociadas con la maduración de células-B en centros germinales (Martínez-Sánchez et al., 2015). La diferenciación de Th1 se habilita estando activas IL-6 e IL-21 (Crotty, 2014). La

activación de IL-6 y STAT3, promueven apoptosis de células-T (Akdis et al., 2011). PD-1 es altamente expresado sobre células Tfh (Pedoeem et al., 2014). Además de IL-21, células Tfh secretan otras citoquinas y receptores (eBioscience, 2015). Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I.

El modelo HPV16-ALIFE, verifica el estado de las citoquinas de polarización IL-6 e IL-21, y también el estado de las células-T activadas que migran hacia los folículos externos para diferenciarse. Si se cumplen las condiciones en el microambiente, se habilita la diferenciación de células Tfh, para lo cual se activan las moléculas diferenciadoras de la población celular BCL6 y STAT3, las moléculas de superficie CD28, CD40L, ICOS y PD1; se activan los receptores TCR, CXCL13, IL-2Ra, IL-5R, IL-6Ra, IL-21R, CD132; y las citoquinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, IL-17F e IL-21.

Paso 20. Activar diferenciación de macrófagos

Pre-requisito: Citoquinas IFN- γ y TNF- α , o LPS activas

Dentro del proceso de diferenciación celular, se incluyen células progenitoras que involucran células madre hematopoyéticas, progenitores multipotentes, progenitores mieloides comunes, progenitores linfoides comunes, y progenitores monocitos-granulocitos, los cuales se explican con mayor detalle en el libro anexo-1, capítulo I. Estos progenitores dan lugar a varios tipos de células diferenciadas, tales como células dendríticas y macrófagos (Álvarez-Errico et al., 2015). La habilitación de macrófagos es dependiente de las citoquinas IFN- γ y TNF- α o LPS (Martínez et al., 2014). IL-4 puede inhibir la producción de TNF e IL-6 (Akdis et al., 2011; eBioscience, 2015). IL-10 inhibe la expresión de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α en macrófagos (Bolpetti et al., 2010; Yuzhalin et al., 2014). IL-10 inhibe la expresión de IL-10, IL-18, GM-CSF en macrófagos (Akdis et al., 2011). IL-11 ha sido reportada por inhibir IL-1 e IL-12 (Shaikh, 2011; Yuzhalin et al., 2014). IL-19 sobreexpresa IL-6 y TNF- α en monocitos (Akdis et al., 2011; eBioscience, 2015; Yuzhalin et al., 2014). IL-23R es expresado por Macrófagos (Akdis et al., 2011). IL-25 (IL17E) suprime respuestas y desarrollo de Th17 mediante inhibición de IL-23 en macrófagos (eBioscience, 2015). IL-30 puede ser inducida por IFN- γ en macrófagos (Dibra et al., 2012). La capacidad de IFN- γ para inducir IL-32 es dependiente de IL-15 en macrófagos (Montoya et al., 2014). IRAK-M está restringido a monocitos y macrófagos (Akira et al., 2004; Van't Veer et al., 2007). IRAK-M está limitado principalmente al linaje de monocitos y es sobreexpresada durante la diferenciación, sugiriendo una función de IRAK-M específica del tipo celular. Expresión IRAK-M inducida por LPS es mediada por TNF- α (Wesche et al., 1999). Proteína E6 de HPV16 bloquea la señalización STAT1 (Tummers et al., 2015). Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I y en el libro anexo-2, capítulo III.

El modelo HPV16-ALIFE, verifica el estado de las citoquinas diferenciadoras del perfil macrófago. Si se cumplen las condiciones en el microambiente, se habilita el perfil de diferenciación de macrófagos tipo M1, para lo cual se activan las moléculas diferenciadoras de esta población celular IRF5, STAT1, moléculas de superficie MHC-II, CD80, CD86; se activan los receptores IL-1R1; y las citoquinas IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23, IL-27, TNF- α , IFN- β . Adicionalmente, se activa la señalización de IRAKM, GM-CSF, G-CSF y M-CSF. De encontrarse activa la expresión de la proteína E6 de HPV16, se bloquea STAT1.

Paso 21. Activar proliferación de macrófagos**Pre-requisito: Población de macrófagos activa**

La citoquina IL-11 regula el proceso de proliferación de monocitos y macrófagos (Akdis et al, 2011; Shaikh, 2011), y además inhibe la síntesis de citoquinas inflamatorias tales como TNF- α , IL-1, IL-12, IFN- γ e iNOS, después de la estimulación LPS (Akdis et al, 2011).

IL-19 sobreexpresa IL-6 y TNF- α , en monocitos (Akdis et al, 2011, eBioscience, 2015; Yuzhalin et al., 2014). IL-30 puede ser inducida por IFN- γ en macrófagos (Dibra, et al., 2012). MIF estimula la liberación de citoquinas pro-inflamatorias a partir de macrófagos, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 (Kasama et al., 2010). IL-23R es expresado por macrófagos (Akdis et al, 2011). IL-25 (IL17E) suprime respuestas y desarrollo de Th17 mediante inhibición de IL-23 en macrófagos (eBioscience, 2015). Enzima A20 es inducida por LPS en macrófagos (Perales-Linares et al., 2013). La capacidad de IFN- γ para inducir IL-32 es dependiente de IL-15 en macrófagos (Montoya et al., 2014). Expresión IRAK-M inducida por LPS está mediada por TNF- α , en macrófagos (Wesche et al., 1999). E6 bloquea la señalización STAT1 en macrófagos (Tummers et al., 2015). En macrófagos, IL-4 inhibe la producción de TNF, IL-1 e IL-6 (eBioscience, 2015). IL-4 unida a los receptores IL-4Ra1 y cadena gamma (γ c), puede activar la vía JAK1, JAK3 y conducir a la activación y traslocación de STAT6. IL-10 unida a los receptores IL-10R1 e IL-10R2, conduce a la activación de las vías JAK1-STAT3 y TYK2-STAT5-STAT1 (Martínez et al., 2014).

El modelo HPV16-ALIFE, valida que exista previamente una población de macrófagos a partir de la cual activa sus procesos proliferativos. Una vez generadas las células hijas, se activan las moléculas de superficie MHC-II, CD80 y CD86; la secreción de citoquinas TNF- α , IFN- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-22, IL-23, IL-27; los receptores IL-1R1, y factores iNOS, GM-CSF, G-CSF, M-CSF. Adicionalmente, se controla la respuesta de la interacción entre la población macrófaga y ciertas citoquinas en estado activo, como es el caso reportado con IL-4 (Martínez et al., 2014), IL-10 (Martínez et al., 2014; Wynn et al., 2013), IL-11 (Akdis et al., 2011; Shaikh, 2011), IL-19 (eBioscience, 2015), IL-23 (Wynn et al., 2013), IL-25 (eBioscience, 2015), IFN- γ (Martínez et al., 2014), MIF (Kasama et al., 2010) y también con LPS (Kelly et al., 2015).

Paso 22. Activar mantenimiento población queratinocitos**Pre-requisito: Población de queratinocitos activa**

Los queratinocitos (KCs) conforman la mayoría de células en la epidermis de la piel, y constituye la primera línea de defensa contra patógenos cutáneos. Citoquinas innatas son iniciadores claves de las respuestas pro-inflamatorias, las cuales desencadenan la activación de queratinocitos (Bourke et al., 2015). TNF- α inducido por IL-1, puede mantener los queratinocitos en un estado activo, y TNF- α activa respuestas inmunes induciendo producción de TGF- α , IL-1a, IL-1RA, EGFR e ICAM1. KCs expresan principalmente el receptor tipo I. Tres (3) efectos intracelulares son causados por receptores TNF- α , a saber: apoptosis a través de caspasas, producción de ceramidas que alimentan la vía MAPK, y activación de dominio TRADD. La unión de ligandos apropiados a EGFR puede activar queratinocitos. Activación de receptores IFN inicia cascada de fosforilación de proteínas (Freedberg et al., 2001). Células Th1s producen IFN- γ , TNF- α , y expresan CD40L, lo cual induce la producción de cambios proliferativos en KCs (Tummers et al., 2015). Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I y en el libro anexo-2, capítulo III.

El modelo HPV16-ALIFE, verifica el estado de las citoquinas que inducen mantenimiento de queratinocitos. Si se encuentran en estado activo, se verifica la vía de señalización asociada y se procede a activar la expresión de las moléculas, factores de crecimiento y citoquinas relacionadas. De encontrarse activos TNF- α y el receptor TNF-R1, se habilita la vía TRADD, FADD, RIP1, caspasa-8, y se verifica la vía de apoptosis. Si TNF- α , TNF- β y el receptor TNF-R2 se encuentran activos, se habilita la vía TRAF2, RIP1, NIK, y se verifica la vía NIK. TNF- α y TNF- β activos, habilitan TAK1 y JNK. Adicionalmente, se verifica la combinación de otras citoquinas en el microambiente para desencadenar la activación de cascadas de señalización específicas, como es el caso con EGFR, TGF- α o EGF, también IFN- γ , IFN- γ R2, además de IFN- γ , IFN- γ R1.

Paso 23. Activar procesos de interacción entre poblaciones celulares y HPV16

Pre-requisito: Población NKs y CTLs activas, HPV16 positivo activo

En esta etapa, se evalúa la interacción entre células infectadas por HPV16 y poblaciones de células NK y CTLs.

Frente a la interacción HPV16 y células NK, si una célula NK madura llega a ser activada como resultado del encuentro con un ligando extraño y realiza sus tareas, se cree que muere tan pronto lo hace. Si la misma célula no llega a ser activada, se cree que muere con una vida promedio de dos (2) semanas (Sun et al., 2011; Zhang et al., 2007). ICAM1 es un ligando para LFA1. ICAM1 puede desencadenar tanto la adhesión como la citotoxicidad de NKs (Chan et al., 2014). El compromiso de LFA1 en concierto con una segunda señal (perforin, granzyme, IFN- γ), puede ayudar a células NK a realizar lisis de su célula objetivo (Mace et al., 2014). Células NKs predominan en la etapa inicial de la infección y en lesiones de bajo grado (Song et al., 2015). Información más detallada de esta población celular es proporcionada en el libro anexo-1, capítulo I y en el libro anexo-2, capítulo III.

De cara a la interacción entre HPV16 y CTLs, es importante destacar que los queratinocitos (KCs) constituyen los objetivos principales de CTLs específicos de antígeno. La sobreexpresión de proteínas E5 o E7 de HPV16 hace los KCs resistentes a lisis mediada por CTLs (Tummers et al., 2015). KCs infectados expresan bajos niveles de MHC-I, resultando en el daño de las funciones CTLs. Los KCs cervicales neoplásicos, expresando altos niveles de proteínas E6 y E7 de HPV16, pueden escapar del ataque de CTLs (Song et al., 2015).

El modelo HPV16-ALIFE, evalúa el microambiente bajo condiciones de infección por HPV16. Por parte del huésped, se verifica el estado que reportan LFA1, ICAM1, Perforin y Granzyme. Por parte del virus, se verifica que exista una condición de infección por HPV16 positivo, que no se encuentre activa la expresión de E5, E6 y E7. Si estas condiciones se cumplen, CTLs se encuentran en condiciones de eliminar células infectadas (queratinocitos) por HPV16.

Paso 24. Activar proliferación población células NK

Pre-requisito: Población células NKs activa

La proliferación de células NKs se presenta cuando en estado infeccioso, las citoquinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-15 y su receptor IL-15R, se encuentran activos (Biron et al., 1999; eBioscience, 2015; Yoon et al., 2015).

Células NKs pueden promover la diferenciación indirecta de nuevas células- T hacia células Th1 por la producción IFN- γ (Mills, 2011). Las células NK proporcionan respuestas rápidas ante células infectadas por virus, actuando tres (3) días después de la infección (Whiteside et

al., 1990). IL-3 es expresada por células NK (Akdis et al., 2011; Shaikh, 2011). La secreción de IL-12 puede ser desencadenada por IL-15 e IFN- γ por células NKs (Yuzhalin et al., 2014). IL-23R es activado por células NKs (Akdis et al., 2011). NKs expresan LFA-1 en reposo, lo cual le permite adhesión a un objetivo (Mace et al., 2014). PD-1 es expresado sobre células NK (Pedoeem et al., 2014). IL-13 induce la producción de IFN- γ por células NKs (eBioscience, 2015). IL-18 junto con IL-2, induce la producción de IL-13 en células NKs (Akdis et al., 2011). IL-2 e IL-15, conducen a la sobreexpresión de perforin y granzyme, así como también a la producción de IFN- γ , TNF- α y GM-CSF en NKs. IL-21 e IL-15, inducen la producción de IFN- γ por células NKs (Sim et al., 2014). IL-32 en NK, se produce después de la estimulación con IL-2, IL-18 e IFN- γ (Yu et al., 2015). TGF- β es un fuerte antagonista de la producción de IFN- γ en células-T CD8+ y células NKs (Lippitz, 2013; Shaikh, 2011). IL-10 desregula IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α en células NKs (Bolpetti et al., 2010; Yuzhalin et al., 2014). En cáncer e infección por HPV, los receptores NKp30 y NKp46, son encontrados en bajos niveles, generando baja citotoxicidad NK (Amador-Molina et al., 2013).

El modelo HPV16-ALIFE, verifica inicialmente las condiciones de un microambiente infeccioso y valida que las citoquinas IL-2, IL-15, IL-15R, IFN- γ , TNF- α y TNF- β se encuentren en estado activo. Cumplidas estas condiciones, se generan las células hijas y sobre éstas se activan las moléculas de superficie NKG2, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, LFA-1; las proteínas perforin, granzyme, PD-1 y GM-CSF; se activa la expresión de citoquinas IL-3, IL-17A, IL-22, IFN- γ , TNF- α ; y los receptores IL-2Ra, IL-12R, CXCR1, e IL-23R sólo si IL-23 se encuentra activa. Luego, se validan las interacciones que pueden modificar algunos de los componentes en el microambiente inducidos por esta población celular. En condiciones de cáncer, se inhiben las moléculas de superficie NKp30 y Nkp46. De encontrarse activo TGF- β se inhibe la producción de IFN- γ . Si la citoquina IL-10 se encuentra activa, se inhibe la expresión de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , TNF- α . De igual forma, se verifica la simultaneidad en la expresión de citoquinas que pueden afectar la expresión de otras. Tal es el caso que se presenta con las citoquinas IL-15 e IFN- γ , que expresadas en simultánea pueden activar la expresión de IL-12; IL-18 e IL-2, y pueden activar la expresión de IL-13; además, IL-21 e IL-15 pueden activar la expresión de IFN- γ .

Paso 25. Activar procesos de apoptosis según población celular

Pre-requisito: Ciclo de apoptosis activo

En esta etapa se evalúa el ciclo de muerte celular programada para las diferentes poblaciones celulares que intervienen en el modelo HPV16-ALIFE, teniendo en cuenta las variables de ambiente que les afecta de forma específica. Estas actividades se realizan sobre poblaciones de células T-CD4+ (Kaech et al., 2002), T-CD8+ (Kaech et al., 2002; Nussbaum et al., 2004; Van Lier et al., 2003; Zhang et al., 2005), células-T foliculares (Martinez-Sánchez et al., 2015; Pedoeem et al., 2014; Sage et al., 2015), anticuerpos (eBioscience, 2015; Nutt et al., 2015), células-B progenitoras (Gao et al., 2012; Leonard et al., 2005), células-B de memoria y plasma de corta vida (Bortnick et al., 2013; Manz et al., 2002), células-B de memoria y plasma de larga vida (Bortnick et al., 2013; Manz et al., 2002; Tarlinton, 2012), células dendríticas (Chen et al., 2013; Degli-Esposti et al., 2005; Kushwah et al., 2010; Merad et al., 2009), células dendríticas foliculares (Rezk et al., 2013), macrófagos (Akdis et al., 2011; Yuzhalin et al., 2014) células NK (Lutz et al., 2011; Sun et al., 2011; Zhang et al., 2007), células-T ayudadoras (Wells et al., 1999), células Treg (Bataglia et al., 2009; Pierson et al., 2013), queratinocitos (Raj et al., 2006), y CTLs (Ito et al., 2010; Jenkins et al., 2010). Si las variables de ambiente y las células se encuentran marcadas con moléculas de muerte celular programa activa, el modelo procede a su eliminación.

En general, el modelo evalúa las condiciones de ambiente (citoquinas, factores de muerte) que marcan una célula para inducir muerte celular programada, además considera los tiempos de vida media de cada una de las poblaciones, cuando la información existe.

3.1.6.3.2. Paso a paso segundo nivel. Microambiente TLRs

La participación de TLRs en inmunidad adaptativa, se ha mostrado en la modulación de la activación de células T y B. Se ha propuesto que las TLRs en células-B constituyen la tercera señal esencial para la activación completa, junto con el desencadenamiento BCR e interacción con células-T. Además, las TLRs se encuentran involucradas en la maduración de células-B por CSR, SHM, inducción y mantenimiento GC y células-B de memoria, diferenciación a células plasma y producción de anticuerpos. La estimulación de TLR con LPS puede inducir IgGb, mientras que IL-4 puede bloquear este proceso en CSR. La estimulación de TLR9 en nuevas células-B humanas ha sido requerida para CSR dirigida hacia IgG e IgA. La estimulación de TLR9 independiente de células-T con CpG, en combinación con tratamiento IL-10 de nuevas células-B, mejora la expresión de la activación AID (*induced deaminase*) y la posterior CSR dirigida hacia IgG1, IgG2, e IgG3. La estimulación de TLR4 y TLR7, mejora significativamente los títulos de anticuerpos sobre inmunización. La inmunización con CpG vinculada a la proteína antígeno, mejora la proliferación de células-B y diferenciación de células plasma. Para la inducción de una respuesta inmune antiviral, la expresión MyD88 en células-B ha mostrado ser esencial. Nuevas células-B estimuladas por CpG, comienzan proliferando y se diferencian en células plasma produciendo IgM, con incrementada expresión de moléculas de superficie involucradas en presentación de antígenos tales como HLA-DR, CD40 y CD80 (Akira et al., 2004; InvivoGen, 2015; Isaza-Correa et al., 2014; Kanzler et al., 2007; Kawai et al., 2010; Kopp et al., 2003; Lim et al., 2013; O'Neill et al., 2013; Zhou et al., 2013; Zhu et al., 2010). El libro anexo-1, capítulo II, explica en detalle el comportamiento de cada una de los TLRs así como sus correspondientes componentes y vías de señalización.

Paso 26. Activar Interacción-TLRs

Pre-requisito: Interruptores TLRs activados

El modelo HPV16-ALIFE, verifica el estado de cada uno de los interruptores que denotan la activación o inactivación de cada TLR involucrada en el modelo, visto desde el microambiente extracelular. Si se encuentra activo un interruptor TLR, se activa un ligando asociado por defecto, se verifica que el estado infeccioso exista, para posteriormente simular la activación receptor-ligando y luego habilitar y desencadenar las vías de señalización correspondiente, las cuales se explican a continuación.

Luego de estimular cada una de las vías activas, el modelo verifica en el microambiente celular del modelo, el estado de los reguladores negativos TLRs, tales como A20, Pellino3, TANK1, IRAK-M, SOCS, PP2A (documentados en el libro anexo-1, numeral 2.6.1), y de encontrarse alguno o varios de ellos en estado activo, se simulan las acciones correspondientes.

Paso 26.1. Activar vía señalizaciónTLR3

Pre-requisito: Interruptor TLR3 activado

TLR3 está localizado en el retículo endoplasmático de células no estimuladas, y luego de la estimulación dsRNA, se traslada al endosoma al encuentro de su ligando, a través de un

mecanismo dependiente pH que también requiere la dimerización TLR3. La interacción entre la proteína membrana del retículo endoplasmático UNC-93B y TLR3, es fundamental para el tráfico y señalización de TLR3. El reclutamiento de TRIF por la dimerización TLR3 y fosforilación Tyr, resulta en la estimulación de factores de transcripción IRF3, NF- κ B y AP-1, a través de dos caminos. Un camino, se realiza a través de la asociación con TRIF y con TRAF3, junto con TBK1 y el complejo I κ B e IKK ϵ , y posteriormente promueven la fosforilación, dimerización y translocación de IRF3 al núcleo. El otro camino, conduce a la activación de NF- κ B y AP-1, y está mediado por RIP1 y TRAF6, los cuales interactúan con TRIF y reclutan TAB2, TAB3 y TAK1. Lo cual resulta en la activación del complejo IKK y la vía MAPK, y luego la activación de NF- κ B y AP-1, respectivamente. Estas vías, posteriormente conducen a tres (3) resultados: (a) desarrollo de la respuesta antiviral mediada por la activación IRF3 y posterior producción de IFN tipo I, (b) un efecto citopático o muerte celular a través de la activación caspasa-8, mediante RIP1, y (c) la generación de un ambiente pro-inflamatorio mediante la activación de NF- κ B y AP1 (InvivoGen, 2015; Kawai et al., 2010; O'Neill et al., 2013; Perales-Linares et al., 2013). Información más detallada puede ser revisada en el libro anexo-1, capítulo II y en el libro anexo-2, capítulo IV.

La vía de señalización TLR3 en el modelo HPV16-ALIFE, se activa asumiendo el ligando Poly(I:C) (*polyriboinosinic polyribocytidylic*). Se simula la cascada de señalización previamente descrita, activando cada uno de sus componentes y desactivando aquellos que se vean afectados por reguladores negativos.

Paso 26.2. Activar vía señalización TLR4

Pre-requisito: Interruptor TLR4 activado

TLR4 es el único que utiliza todos los cuatro (4) adaptadores y activa tanto la vía dependiente de MyD88 como la vía dependiente de TRIF. TLR4 inicialmente recluta TIRAP en la membrana plasma y posteriormente facilita el reclutamiento de MyD88, que luego desencadena en la activación de NF- κ B y MAPK. TLR4 se somete a endocitosis y se transporta al endosoma, donde forma un complejo de señalización con TRAM y TRIF, para iniciar la vía dependiente de TRIF, que conduce a la activación de IRF3, así como también a la activación de fase tardía de NF- κ B y MAPK. Ambas vías, las cuales son requeridas, conducen a la inducción de citoquinas pro-inflamatorias (InvivoGen, 2015; Kawai et al., 2010; O'Neill et al., 2013). Información más detallada puede ser revisada en el libro anexo-1, capítulo II y en el libro anexo-2, capítulo IV.

La vía de señalización TLR4 en el modelo HPV16-ALIFE, se activa asumiendo el ligando LPS (*lipopolysaccharide*). Se simula la cascada de señalización previamente descrita, activando cada uno de sus componentes y desactivando aquellos que se vean afectados por reguladores negativos.

Paso 26.3. Activar vía señalización TLR7 o TLR9

Pre-requisito: Interruptor TLR7 activado o interruptor TLR9 activado

La ligadura de TLR7 y TLR9 con sus agonistas, desencadena una cascada de señalización que comienza con el reclutamiento de la molécula adaptadora MyD88, mediante TIR. Esto activa el ensamble de un complejo de transducción de señal multiproteína en el citoplasma que está conformado por IRAKs, de donde pueden derivarse dos (2) caminos. De una parte, el complejo IRAK4 e IRAK2, junto con el adaptador TRAF3, se asocian con IKK α , lo cual conduce a la activación de IRF7 y posterior activación de Interferones tipo I. De otra parte, el complejo IRAK4 e IRAK2, junto con el adaptador TRAF6, conduce a la activación del complejo

NEMO (IKK α , IKK β) y MAPK, que luego conducen a la activación de NF- κ B y p38, JNK, ERK, respectivamente, para luego inducir la activación de citoquinas pro-inflamatorias (Hirsch et al., 2010; InvivoGen, 2015; O'Neill et al., 2013). Información más detallada puede ser revisada en el libro anexo-1, capítulo II y en el libro anexo-2, capítulo IV.

La vía de señalización TLR7 y TLR9 en el modelo HPV16-ALIFE, se activan asumiendo el ligando CpG DNA (*cytidine-phosphate-guanosine*). Se simula la cascada de señalización previamente descrita, activando cada uno de sus componentes y desactivando aquellos que se vean afectados por reguladores negativos.

3.1.6.3.3. Paso a paso tercer nivel. Microambiente Citoquinas

Las citoquinas son pequeños péptidos que bajo condiciones fisiológicas controlan la comunicación entre células (Paradkar et al., 2014). La respuesta inmune innata, como primera línea de defensa contra patógenos, se cree que es fundamental para el control temprano de la infección por HPV. Se ha mostrado que los queratinocitos infectados por HPV muestran una rápida inducción de importantes células de respuesta inmune, tales como células NK, acompañadas por la producción y liberación de una variedad de citoquinas, que se enfocan en el reclutamiento y se encargan de coordinar las funciones de células esenciales para el control del patógeno (Scott et al., 2013). Información más detallada puede ser revisada en el libro anexo-1, capítulo II y en el libro anexo-2, capítulo IV, numerales 4.3-4.5.

Con lo anterior, el modelo HPV16-ALIFE, en el tercer nivel, se concentra en el control de funciones e interacciones de cada uno de los miembros documentados, que hacen parte de las cinco (5) familias de citoquinas, los cuales incluyen las familias TNF, TGF, IFN, MIF e Interleuquinas.

Paso 27. Activar control citoquinas

Pre-requisito: Citoquina en estado activo.

El modelo HPV-16 verifica previamente que la expresión de la citoquina a controlar, se encuentre en estado activo. Aunque cada una de las citoquinas se explica en detalle en los dos (2) libros anexos, a continuación se presenta una versión resumida para ilustrar el tipo de control que se realiza en el modelo con cada una de ellas.

Paso 27.1. Control familia TNF

Se ha mostrado que TNF (Tumor Necrosis Factor), puede tanto promover como prevenir la formación de tumor, y que una compleja integración de señales puede conducir hacia una respuesta celular de apoptosis/necrosis o sobrevida, inflamación y promoción de crecimiento. Se ha indicado además, que NF- κ B y Jun, junto a otros factores intrínsecos, participan como jugadores claves en su señalización y respuesta, a partir de células normales o transformadas. En su actividad pro-vigilancia inmune, TNF incrementa la función de células NK y CTLs, y en su actividad anti-vigilancia inmune, incrementa la actividad de células supresoras que inducen la secreción del ligando de muerte programada (PD-L1). También puede dar inicio y progresar hacia una condición de auto-inmunidad, la cual puede conducir al desarrollo de linfoma (Lebrec et al., 2015). TNF- α , es miembro de esta familia y participa en la respuesta del huésped por inflamación, inmunidad y defensa contra infecciones virales. Su incrementada expresión ha sido observada en asociación con infección por HPV, tanto en tejidos cervicales normales como en cánceres cervicales. Sus variantes genéticas pueden afectar el sistema

inmune y la infección HPV en el huésped, conduciendo posteriormente a desarrollo de cáncer por HPV (Jin et al., 2013). TNF- β , otro miembro de esta familia, es un potente mediador de inflamación y respuestas inmunes, y se encuentra involucrado en varios procesos biológicos inmunes, tales como proliferación, diferenciación, apoptosis, metabolismo lípido, coagulación y neurotransmisión (Laddha et al., 2013). La señalización TNF se realiza a través de dos (2) diferentes receptores de alta afinidad en la superficie celular, TNFR1 y TNFR2 (Probert, 2015). Información adicional puede ser revisada en el libro anexo 1, capítulo III, numeral 3.1.1 y en el libro anexo-2, capítulo IV, numeral 4.3.1.

El modelo HPV16-ALIFE, activa la expresión de interleuquinas que son inducidas a partir de la expresión de TNF, entre las cuales se cuentan las siguientes. TNF- α induce citoquinas IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 y RANTES (eBioscience, 2015; Shaikh, 2011) y sobreexpresa IL-3 (Yuzhalin et al., 2014). La estimulación con TNF- α junto con IL-1 α , induce la expresión de IL-11. Ante un agente infeccioso, TNF- α activa expresión de IL-18, sobreexpresa IL-36 (Yuzhalin et al., 2014) e IL-27 (Akdis et al., 2011). También expresa MIF y la secreción de su proteína (Kasama et al., 2010), COX-2 (Lee et al., 2010), y activa la familia de quinasas ER (Kannan et al., 2012). TNF- β también estimula la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (Laddha et al., 2013).

Adicionalmente, el modelo activa la cascada de señalización, una vez se une a sus correspondientes receptores (eBioscience, 2015). En este caso, TNF- α unido a su receptor TNFR1 (CD120a), permite reclutar moléculas TRADD y RIP1, para luego inducir NF- κ B y JNK, cIAP1 y cIAP2, activando así la vía canónica de NF- κ B (Bremer, 2013; Tummers et al., 2015). Con base en ello, el modelo activa la vía TRADD, FADD, RIP1, caspasa -8 y activa la vía de apoptosis. Adicionalmente, activa la vía TRAF2, MEK12 y desencadena su correspondiente cascada de señalización, activando también TAK1. Cuando la citoquina TNF- α se une a su receptor TNFR2 (CD120b), modula la señalización de un estado inflamatorio a uno que desencadena muerte celular, reclutando cIAP1, cIAP2 y TRAF3, resultando en la degradación de TRAF3, activando así la vía no-canónica (Bremer, 2013). Bajo este escenario, el modelo verifica previamente la condición de infección y el estado activo de los receptores. Junto con el receptor TNFR1, habilita la vía TRADD, FADD, y activa FasL, cIAP1 y cIAP2. En unión al receptor TNFR2, se inhibe TRAF3 y permanecen activos cIAP1 y cIAP2. Cuando el modelo encuentra activos TNF- α , TNF- β y el receptor TNFR2, habilita la vía TRAF3, TRAF2, RIP1 y continúa con la activación de la vía NIK.

El modelo HPV16-ALIFE, también valida las interacciones frente a las proteínas expresadas por HPV16, en condiciones de infección persistente y desarrollo de cáncer cervical, dado que la expresión de E6 y E7 asociadas con TNF, han sugerido un rol en carcinogénesis por HPV (Jin et al., 2013). Bajo condiciones de cáncer cervical, la unión de TNF- α con sus receptores, activa la vía TRAF2 (Paradkar et al., 2014), E6 se une al receptor TNFR1 (CD120a) para proteger las células de la apoptosis, y E7 mediada por TNF- α , sensibiliza queratinocitos ante apoptosis (Yuan et al., 2005).

Paso 27.2. Control familia TGF- β

Las funciones pleiotrópicas de TGF (*Transforming Growth Factor*), le permite tener funciones en la regulación de crecimiento, diferenciación, apoptosis, motilidad e invasión celular, producción de matriz extracelular, angiogénesis y respuesta inmune. La desregulación de su señal puede estar involucrada en el desarrollo de tumores y metástasis. Su influencia se extiende más allá de las propias células cancerosas, hasta el microambiente tumoral y a todo

el organismo. Aunque existe debate respecto a su doble rol, TGF- β puede contribuir a generar un microambiente favorable al crecimiento y metástasis tumoral, en todos los pasos de carcinogénesis. También puede ser considerado como una estrategia enfocada en el microambiente, en terapia de cáncer enfocada en la vía TGF- β (Neuzille et al., 2015; Pickup et al., 2013; Terabe et al., 2014). La señalización TGF- β se realiza a través de dos (2) diferentes receptores, TGFBR1 y TGFBR2. La unión con el receptor TGFBR2 conduce al reclutamiento de TGFBR1, el cual luego fosforila sus objetivos corriente abajo, activando sus vías de señalización (Probert, 2015; eBioscience, 2015). Información adicional puede ser revisada en el libro anexo-1, capítulo III, numeral 3.1.2 y en el libro anexo-2, capítulo IV, numeral 4.3.2.

El modelo HPV16-ALIFE, modifica la expresión de interleuquinas que se ven afectadas a partir de la expresión de TGF- β , entre las cuales se cuentan las siguientes. TGF- β suprime la expresión de IL-12, limita la producción de TNF, inhibe IL-2 y la proliferación inducida por IL-2 en células-T (Lippitz, 2013; Pickup et al., 2013). TGF- β sobreexpresa la expresión de IL-10 tanto en células normales como en células cancerosas (Lippitz, 2013; Yuzhalin et al., 2014), inhibe la producción de IFN- γ , mediante la supresión del factor de transcripción T-bet que se considera esencial en el proceso de diferenciación de TCD4+ (Lippitz, 2013), suprime significativamente la expresión de IL-31 a nivel de proteínas y mRNA (Maier et al., 2014). Además, TGF- β en sinergia con IL-1 α , aumenta la producción de IL-11, induce la producción de altos niveles de IL-37 (Akdis et al., 2011), estimula la expresión de MIF y la secreción de su proteína (Kasama et al., 2010).

Adicionalmente, el modelo activa la cascada de señalización una vez se une a sus correspondientes receptores (eBioscience, 2015). La unión de TGF- β al receptor TGFBR2, habilita el receptor TGFBR1, y posteriormente activa PI3K, AKT, TAK1, MEK4-7, JNK y cJun. Así mismo, TGF- β unido a TGFBR1, activa la vía Smad2-Smad3, junto con PP2A.

El modelo HPV16-ALIFE, también valida las interacciones frente a las proteínas expresadas por HPV16 y desarrollo de cáncer. En infección persistente por HPV16, TGF- β junto con IL-10, contribuyen a un entorno local inmuno-suprimido (Pickup et al., 2013; Torres-Poveda et al., 2014). En cáncer cervical inducido por HPV16, TGF- β junto con sus receptores, activa la vía Smad2-Smad4 (Paradkar et al., 2014), y las proteínas E6 y E7, regulan su alta expresión bajo esta condición (Bermúdez-Morales et al., 2008).

Paso 27.3. Control familia IFNs

Los Interferones (IFNs), muestran diferentes patrones de expresión y juegan importantes roles en la defensa del huésped (Hoffmann et al., 2015). Su inducción ocurre en respuesta a infección por virus o bacterias. Con base en su estructura y receptores, están clasificados en tres tipos (I, II, III) de interferones. El tipo I, comprende IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω ; el tipo II solo tiene el IFN- γ ; y el tipo III, comprende IFN- λ 1, IFN- λ 2, e IFN- λ 3 (eBioscience, 2015). Por su capacidad para modular respuestas inmunes, han sido considerados como una opción de tratamiento para varios tipos de cánceres y enfermedades autoinmunes (Lace et al., 2015; Lin-CF et al., 2014). Los receptores de IFNs tipo I y II, tienen estructuras multicanales, conformadas por al menos dos (2) subunidades, IFNAR1 e IFNAR2 para IFN tipo I, y IFN γ R1 e IFN γ R2 para IFN tipo II. Los receptores de IFN tipo III, corresponden a IFN- λ R1 e IL-10R2 (Donnelly et al., 2010; eBioscience, 2015; Ivashkiv et al., 2014; Parhi et al., 2015). La unión de los IFNs a sus correspondientes receptores desencadena sus respectivas vías de señalización. Información adicional puede ser revisada en el libro anexo-1, capítulo III, numeral 3.1.3 y en el libro anexo-2, capítulo IV, numeral 4.3.3.

El modelo HPV16-ALIFE, únicamente simula el comportamiento de IFN- α , IFN- β , IFN- γ e IFN- λ , controlando la expresión de otras citoquinas que se ven afectadas a partir de su activación, entre las cuales se cuentan las siguientes. IFN- α regula la expresión de TNF- α , IL-6 y los receptores de las interleuquinas IL-1, IL-2, IL-4 e IL-18. En sinergia con IL-18, IFN- α induce la transcripción de IFN- γ y la expresión de su correspondiente proteína (Brassard et al., 2002). Varios tipos de células infectadas producen la expresión de IFN- β (Muto et al., 2011). IFN- α e IFN- β , inhiben la producción de IL-12 (Akdis et al., 2011). IFN- γ sobreexpone IL-3 (Yuzhalin et al., 2014), el receptor IL-22R1 (Akdis et al., 2011), e IL-37 (Akdis et al., 2011; Yuzhalin et al., 2014), y también induce IL-18BP el cual funciona como inhibidor de IL-18 (Akdis et al., 2011; Lippitz, 2013). IFN- γ estimula la expresión de MIF y la secreción de su proteína (Kasama et al., 2010). IFN- γ junto con IL-15, pueden desencadenar la secreción de IL-12 (Yuzhalin et al., 2014); junto con LPS, sobreexpone IL-31RA (Akdis et al., 2011). IFN- γ afecta negativamente la producción de IL-2 (Yuzhalin et al., 2014), inhibe la producción de TGF- β (Lippitz, 2013), y expresa COX-2 (Lee et al., 2010). IFN- λ (IL28A, IL28B, IL29), usualmente son co-expresados junto con IFNs tipo I, por células infectadas por virus (Donnelly et al., 2010).

El modelo HPV16-ALIFE, activa la cascada de señalización una vez se presenta la unión entre los interferones y sus correspondientes receptores (eBioscience, 2015). IFN- α e IFN- β unidos a sus receptores, conduce a la señalización de la vía JAK-TYK2 y activación STAT1-STAT2-IRF9. IFN- γ unido a sus receptores, resulta en la activación de JAK1-JAK2 y reclutamiento de STAT1 (eBioscience, 2015; Tummers et al., 2015). IFN- λ unido a sus receptores, activa las vías JAK1-STAT2-STAT1, y TYK2-STAT1 (Donnelly et al., 2010; eBioscience, 2015).

Además, el modelo verifica las interacciones frente a las proteínas expresadas por HPV16 y desarrollo a cáncer. La expresión de E7 de HPV16 daña la presentación de antígenos endógenos inducida por IFN- γ a partir de CTLs, puede represar moléculas MHC clase I, entre otras interacciones (Lace et al., 2015; Muto et al., 2011; Park et al., 2000; Ronco et al., 1998; Weck et al., 1986; Zhou et al., 2011), las cuales se desarrollan en el aparte denominado “validar interacción entre HPV16 y citoquinas”, referido en el paso 28 de este documento.

Paso 27.4. Control familia MIF

La citoquina MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), es una citoquina pro-inflamatoria con funciones semejantes a quimioquinas (Klasen et al., 2014), juega un rol importante en desórdenes inmunes e inflamatorios, se ha mostrado que se encuentra involucrado en progresión y desarrollo de cáncer, y se ha sugerido como un nuevo marcador molecular en el diagnóstico y terapia de adenocarcinoma cervical (Guo et al., 2015). La interacción de MIF con su receptor CD74 y co-receptores CXCR2 y CXCR4, ha mostrado promover supervivencia de linfocitos-B en nichos inmunes de la médula ósea, respuestas de supervivencia y proliferación, y migración de macrófagos y células-B (Klasen et al., 2014). Información adicional puede ser revisada en el libro anexo-1, capítulo III, numeral 3.1.4 y en el libro anexo-2, capítulo IV, numeral 4.3.4.

El modelo HPV16-ALIFE, simula el comportamiento de MIF, controlando la expresión de otras citoquinas que se ven afectadas a partir de su activación, entre las cuales se cuentan las siguientes. MIF estimula la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en un circuito de retroalimentación positiva, las cuales incluye TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 (Lippitz, 2013). Sobreexpone las moléculas de adhesión E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, y Junto con LPS, estimula la expresión de MIF y la secreción de su proteína (Kasama et al., 2010). MIF, también se ha identificado como regulador negativo de *p53* (Guo et al., 2015).

Paso 27.5. Control familia Interleuquinas

Las interleuquinas (ILs), son fundamentales en la respuesta inmune y son producidas como una parte integral de la respuesta inmune innata, con la capacidad para influenciar los resultados y la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa. También son consideradas importantes objetivos terapéuticos, por lo que cualquier cambio en su secuencia o estructura puede conducir a alteraciones en su normal funcionamiento (Neves et al., 2015). Las ILs coordinan la comunicación intercelular, creando señales específicas tanto de forma autocrina como paracrina. Cada una de las ILs cuenta con un receptor dependiente del ligando, el cual es expresado sobre la superficie de la célula objetivo. El primer paso en la activación del receptor, comienza con la unión de la IL a su correspondiente receptor sobre la superficie celular, formando un complejo que conduce a cambios conformacionales en el receptor de la interleuquina, para luego unirse a quinasas que les permite autofosforilar. El segundo paso, comienza con la autofosforilación de quinasas JAKs, que induce cambios conformacionales a su propia estructura, lo cual les permite luego fosforilar y activar STATs. Finalmente, los STATs activados, se disocian del receptor y forman dímeros antes de trasladarse al núcleo de la célula, donde ellas regulan la transcripción de agrupamientos de genes seleccionados. Actualmente, las interleuquinas son consideradas uno de los más importantes agentes involucrados en carcinogénesis humana (Yuzhalin et al., 2014). Información adicional puede ser revisada en el libro anexo-1, capítulo III, numerales 3.1 a 3.3 y en el libro anexo-2, capítulo IV, numerales 4.3 a 4.5.

El modelo HPV16-ALIFE, simula la secreción a partir de poblaciones celulares y las interacciones que se presentan con otras interleuquinas y con sus propios receptores, así como también las vías de señalización que pueden desencadenar treinta y tres (33) diferentes interleuquinas, incluyendo su comportamiento frente a procesos infecciosos virales y desarrollo de cáncer a partir de HPV16. Las interleuquinas incluidas en el modelo son las siguientes: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26., IL-27, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36 e IL-37.

El modelo HPV16-ALIFE, verifica el estado que reporta la interleuquina (IL) al momento de evaluarla en su microambiente. De encontrarse activa, se verifican las interacciones en el vecindario con otras citoquinas y también con sus receptores, lo cual puede resultar en la activación o inactivación de la expresión de tales ILs, según sea el caso. Por ejemplo, IL-1 desencadena la expresión de IL-6 e IL-18; sobrerregula la expresión de IL-36 e IL-37 (Akdis et al., 2011; Yuzhalin et al., 2014); y también puede activar la familia de quinasas ERK (Kannan et al., 2012). Adicionalmente, el receptor IL-1RA puede bloquear la señalización de IL-1 e inhibir la expresión de VEGF inducida por IL-1 β (Yuzhalin et al., 2014).

El modelo HPV16-ALIFE, verifica en el microambiente la coincidencia de las interleuquinas y sus receptores en estado activo, para desencadenar la cascada de señalización correspondiente. Por ejemplo, IL-22 junto a su receptor IL-22R1, activa la vía JAK-STAT1-STAT3-STAT5-SOCS3; y cuando se une al receptor IL-10R2, activa la vía TYK2-STAT1-STAT3-STAT5-SOCS3 y *p38* (eBioscience, 2015). Esta actividad se realiza sobre las treinta y tres (33) diferentes interleuquinas incluidas en el modelo de vida artificial, de acuerdo con la información consignada en los dos (2) libros anexos.

Además, el modelo verifica las interacciones de cada IL específica frente a los diferentes estados que se originan a partir de una infección por HPV16 y posterior desarrollo a cáncer

cervical. Por ejemplo, en condiciones de cáncer cervical, IL-6 y sus receptores, activan la vía de señalización JAK3, PI3K y AKT, junto con JAK1 y STATs1-3 (Paradkar et al., 2014). En estado de infección por HPV16, la sobreexpresión de IL-8 está correlacionada con la expresión de las metaloproteinasas MM2 y MMP9 (Amador-Molina et al., 2013). Esta actividad se realiza con cada una de las interleuquinas que se vean afectadas por estos eventos de acuerdo con la información contenida en las publicaciones actuales.

Paso 28. Validar interacción entre HPV16 y citoquinas

Pre-requisito: Niveles de expresión de proteínas HPV16 activas

La infección por HPV incrementa la expresión de IFRD1 (*interferon-related developmental regulator 1*) por la vía mTOR (Tummers et al., 2015). HPV16 sobreexpresa UCHL1, resultando en señalización negativa de TRAF3, TRAF6 y NEMO (Karim et al., 2013; Tummers et al., 2015). AIM2 en estado activo, induce la expresión de las citoquinas IL-1 β e IL-18 y sirve como supresor de IFN- β . A su vez, IFI16 bloquea AIM2 y libera IFN- β (Reinholz et al., 2013).

Los queratinocitos cervicales que albergan HPV16 positivo producen TNF- α (Deshpande et al., 2005). HPV16 evita la función de IL-1 β , y en consecuencia, la respuesta inmune innata atenuada contra células infectadas favorecen la persistencia viral, que constituye un paso importante en la iniciación de transformación celular a tumorigénesis (Niebler et al., 2013). IL-1 β contribuye al desarrollo y progresión de tumores malignos (Yuzhalin et al., 2014).

La proteína E2 de HPV16, estimula la expresión génica de IL-10 (Bermúdez-Morales et al., 2011), incrementa la señalización NF- κ B inducida por TNF- α pero no por IL-1, y reduce la expresión de STING e IFN- κ en la cascada de señalización IFN (Tummers et al., 2015). La proteína E5 también activa NF- κ B (Muto et al., 2011; Yuan et al., 2005), y bloquea respuestas apoptóticas en queratinocitos infectados, anulando la expresión de FasL, p21, p27 y TRAIL e induciendo activación EGFR, MAPK, COX2 y PG2E (Pang et al., 2013). Una vez se establece la infección por HPV16, la proteína E6 conduce a la sobreexpresión de IL-17 (Amador-Molina et al., 2013), interfiere con IRF3 disminuyendo el efecto de transactivación de IFN- β (Conesa-Zamora, 2013), promueve la degradación de p53 por medio de su interacción con E6AP (Lee et al., 2010). Este complejo induce la degradación de pro-IL1 β , y como tal, daña la formación de IL-1 β (Tummers et al., 2015). E6 también puede anular el procesamiento y secreción de IL-1 β (Niebler et al., 2013), modular la vía NF- κ B a través de la cual la producción de IL-1 se inicia (Bhat et al., 2011), sobreexpresión de expresiones pro-angiogénicas MMP-2 y MMP-9 a través de la inducción de IL-8 independiente de p53 (Shiau et al., 2013), inducir la señalización de IL-6/STAT3, favoreciendo el desarrollo de cáncer cervical a partir de CIN1 y CIN2 (Ren et al., 2013). La proteína E6 se une a la terminal-C de TNFR1 y a la terminal-N de FADD, acelerando la degradación de FADD (Tummers et al., 2015). La proteína E6, inactiva o degrada p53, TNFR, FADD, Caspasa-8, bloqueando la vía de apoptosis, y además bloqueando IRF3 y la señal IFN- β (Pang et al., 2013).

Las proteínas E6 y E7, son producidas para prevenir la detención del crecimiento celular, apoptosis y retardar la diferenciación, inactivando p53 y pRb, respectivamente (Tummers et al., 2015), suprimen la expresión génica de IFN tipo I y la producción de IL-18 (Lazarenko et al., 2014; Lee et al., 2010; Niebler et al., 2013), y expresadas en queratinocitos, sobreexpresan IL-8 (Shiau et al., 2013). E6 y E7, también incrementan la actividad NF- κ B y pueden activar la transcripción de proteínas inhibitoras de apoptosis tales como XIAP, cIAP1, cIAP2 (Muto et al., 2011; Yuan et al., 2005). Proteínas E5, E6 y E7 de HPV16, han mostrado inducir COX-2 y PGE2 (Read et al., 2014; Lee et al., 2010). E5 y E7 promueven la expresión de TGF- β

(Paradkar et al., 2014). La proteína E7 de HPV16 se une a IRF1 y bloquea la transcripción de IFN- α , en cambio E5 mejora su expresión. E5 también bloquea NF- κ B (Tummers et al., 2015). E7 bloquea *pRb*, *p21*, *p27*, IRF1, IRF9, IL-6, MCL-1 e IFN- β , y además interrumpe actividad caspasa-8 y TNF- α (Pang et al., 2013).

Las citoquinas IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 (promotores de tumores), predominan en HPV16 positivo y lesiones de bajo grado (Fernandes et al., 2005; Rosa et al., 2012; Song et al., 2007). En mujeres con grado CIN, se observa incrementados niveles de IL-1 α , IL-1 β e IL-10 (Paradkar et al., 2014). IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12 (supresores tumor) se han asociado con persistencia de la infección HPV16 y progresión a CIN de bajo grado (Fernandes et al., 2005; Rosa et al., 2012; Song et al., 2007). En condiciones de cáncer, se incrementa IL-10 y la expresión de MMP-1, MMP-9 y VEGF. En carcinogénesis, el exceso en la expresión de IL-8 indica crecimiento y/o metástasis del tumor. IL-6 tiene una estimulación autocrina durante carcinogénesis (Paradkar et al., 2014).

El modelo HPV16-ALIFE verifica que la infección por HPV16 se encuentre activa, con lo cual habilita la expresión de TNF- α . Junto con la expresión activa de mTOR, habilita la expresión de IFRD1 y UCHL1. Si AIM2 se encuentra activo, entonces habilita la expresión de IL-1 β e IL-18 e inhibe la expresión de IFN- β . Si IFI16 se encuentra activo, entonces se inhibe AIM2 y se habilita la expresión de IFN- β . Luego, el modelo verifica el estado que reporta cada una de las proteínas virales.

De encontrarse en estado activo la proteína E2, se habilita la expresión de IL-10. Si junto a ella, también se encuentra activo TNF- α , se habilita la expresión de NF- κ B. Si E5 se encuentra activa, se habilita la expresión de IRF1, IFN- β , EGFR, COX-2, PGE2, cFos, cJun, VEGF, y se inhiben FasL y *p21*. Si encuentra activa la expresión de E6, se habilita la expresión de IL-6, IL-8, IL-17, y se inhibe la expresión de IRF3, IFN- β , *p53*, IL-1 β , BAK, caspasa-8, FADD, TNF-R1, TYK2. La actividad de E6 e IL-8 en simultánea, habilitan la expresión de MMP2 y MMP9. Si E7 se encuentra activa, se inhibe la expresión de IRF1, IFN- α , NF- κ B, *pRb*, *p21*, IRF9, IL-6, MCL1, TNF- α y caspasa-8. La actividad simultánea de E6 y E7, provocan la inhibición de IFN- α , IFN- β , IL-0 e IL-18. La actividad simultánea de E5 y E7, induce la expresión de TGF- β . La actividad simultánea de E5, E6, y E7, habilitan la expresión de COX-2, PGE2, NF- κ B, cIAP1, cIAP2. En condiciones de cáncer activo, se induce la expresión de IL-10, VEGF, MMP1, MMP9, IL-6, e IL-8.

Paso 29. Validar biomarcadores inmunológicos

Pre-requisito: Niveles de expresión de ILs

De acuerdo con el diccionario de términos de cáncer (*NCI Dictionary of Cancer Terms*) del Instituto Nacional de Cáncer (NIH) de los Estados Unidos, un biomarcador es una molécula encontrada en la sangre, otros fluidos del cuerpo, o tejidos que representan una señal o proceso anormal, o de una condición o enfermedad. Un biomarcador puede ser usado para ver que tan bien responde el cuerpo ante tratamientos para una enfermedad o condición. También se denomina marcador molecular y firma molecular (NCI, 2015). Varias citoquinas se han sugerido como potenciales biomarcadores para evaluar el riesgo de desarrollar cáncer invasivo y metástasis, para evaluar eventos importantes relacionados con la persistencia de la infección HPV de alto riesgo y también su participación en diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad, algunas asociadas con crecimiento tumoral y otras asociadas con inhibición de la replicación HPV y supresión tumoral (Paradkar et al., 2014). Información adicional puede

ser revisada en el libro anexo-1, capítulo 3, numeral 3.3 y en el libro anexo-2, capítulo IV, numerales 4.3.5 a 4.3.8.

El modelo HPV16-ALIFE, considera principalmente la información publicada entre los años 2002 y 2015, en la cual se sugieren marcadores a partir de la expresión de algunas citoquinas vinculadas a la evaluación de la persistencia de la infección por HPV, progresión, riesgo de desarrollar cáncer, y cáncer cervical establecido. También se consideran publicaciones en las que se sugieren interacciones entre TLRs y poblaciones celulares específicas (Amador-Molina et al., 2013; Barron et al., 2015; Bermúdez-Morales et al., 2008; Bermúdez-Morales et al., 2011; Brassard et al., 2002; Dasari et al., 2015; Fernandes et al., 2005; Filippova et al., 2005; Jin et al., 2013; Kohaar et al., 2007; Lazarenko et al., 2014; Lee et al., 2010; Lee et al., 2014; Lippitz, 2013; Niebler et al., 2013; Pang et al., 2014; Read et al., 2014; Ren et al., 2013; Rosa et al., 2012; Shaikh, 2011; Shiau et al., 2013; Sim et al., 2014; Song et al., 2007; Song et al., 2015; Tabata et al., 2013; Whiteside, 2010; Xu et al., 2015). Por ejemplo, la expresión de TGF- β en coincidencia con altos niveles de expresión de IL-10, y expresión desregulada de IL-12, IL-2 e IFN- γ , muestran que reacciones inflamatorias pueden ser suprimidas. Así mismo, la expresión de TNF- α , junto con la expresión coincidente de IL-6, IL-8 e IL-10, muestra un microambiente en condiciones inflamatorias.

3.1.6.3.4. Control de vacunas. Microambiente extracelular

Entre varios enfoques, una alternativa de tratar lesiones asociadas con infección por HPV está basada en el desarrollo de vacunas terapéuticas para tumores inducidos por HPV. Este tipo de vacunas requiere la inducción de respuestas inmunes mediadas por células capaces de identificar y eliminar células anormales. Para alcanzar este objetivo, se requiere de una estrecha cooperación entre el sistema inmune innato y adaptativo, en particular, células presentadoras de antígeno (APCs), células-T CD4+ y linfocitos-T citotóxicos (CTLs). En inmunoterapias contra tumores inducidos por HPV, los objetivos principales son las oncoproteínas E6 y E7, y las células infectadas por el virus expresándolas, constituyen el objetivo principal para respuestas citotóxicas inducidas por vacunas (de Oliveira et al., 2015; Haensler et al., 2015; Han et al., 2013; Jinushi et al., 2013; Kroemer et al., 2013; Linch et al., 2016; Melief, 2013; Pang et al., 2013; Senovilla et al., 2013; van Poelgeest et al., 2013; Wang et al., 2014; Wu et al., 2014; Yao et al., 2013; Yaddanapudi et al., 2013; Zhou et al., 2014). Información adicional puede ser revisada en el libro anexo-2, capítulo 4, numerales 4.3.9 y 4.6.

Considerando que el modelo HPV16-ALIFE plantea tres (3) niveles de interacción, es decir, a nivel de poblaciones celulares, TLRs y citoquinas, se cuenta con el potencial para plantear un enfoque de vacuna dirigida a elementos específicos en cada nivel. No obstante, el prototipo que se desarrolla considera la intervención de una vacuna sólo cuando el modelo empieza a desarrollar la condición de cáncer cervical, dado que el principal interés de este trabajo se encuentra centrado en las vacunas terapéuticas más que en las profilácticas, aún cuando también se tiene potencial para el estudio de estas últimas.

La opción de vacunación terapéutica implementada en el prototipo, se basa en el concepto de vacuna terapéutica HPV DNA basada en células dendríticas, que apunta a la expansión de células-T CD8+, que pueden diferenciarse entre CTLs capaces de eliminar células cancerosas. Se permite programar inyecciones con DCs cargadas con antígeno, simulando haber sido tratadas con proteínas E6 y E7 de HPV16, en las que se puede variar la carga, la

dosis, e intervalos entre semanas. Adicionalmente, se permite programar inyecciones con antígenos anti-PD1, en las cuales también es posible variar la carga, dosis e intervalos entre semanas.

Como complemento a lo anterior, pueden ser bloqueadas vías de señalización desencadenadas a partir de TLRs específicos, tales como TLR3, TLR4, TLR7/TLR8, TLR9 y/o bloquear o activar componentes específicos en sus respectivas vías.

Adicionalmente, se cuenta con la opción de bloquear y/o activar la expresión de cualquiera de las citoquinas consideradas en el modelo. Todas estas posibilidades se encuentran reunidas en una interface que será explicada más adelante.

No obstante lo anterior, es importante aclarar que el prototipo tiene potencial para simular otros tipos de vacunas terapéuticas, pero por limitaciones iniciales de tiempo, sólo se implementan las opciones de las vacunas referidas.

IV IMPLEMENTACIÓN PROTOTIPO APLICACIÓN VIDA ARTIFICIAL

El presente capítulo hace referencia a la herramienta utilizada en la construcción del prototipo funcional y presenta una descripción detallada de la lógica implementada. Se explican las herramientas incorporadas al prototipo, las cuales permiten observar el comportamiento que surge a partir de la interacción entre sistema inmune (innato y adaptativo), HPV16 y una vacuna terapéutica (sea que se aplique o no). Finalmente se realiza una discusión sobre los parámetros globales y parámetros de control utilizados en el modelo de vida artificial propuesto.

4.1 IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOTIPO DE UNA APLICACIÓN DE VIDA ARTIFICIAL

El prototipo correspondiente a “una aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus de papiloma humano tipo 16”, como agente etiológico de cáncer de cuello uterino, ha sido desarrollado con la herramienta de programación “NetLogo 5.3” (Wilensky, 1999), considerando que permite modelar entornos complejos para simulación de fenómenos naturales y sociales. Adicionalmente, el componente correspondiente al ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16 (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013; Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010), el cual hace parte integral del presente trabajo, también fue desarrollado con esta herramienta, lo cual facilita su integración.

4.1.1 Características de la herramienta de desarrollo

La herramienta de software utilizada en la construcción del prototipo del modelo de vida artificial en cuestión, permite generar instrucciones a diferentes agentes que operan de forma independiente, lo cual hace posible explorar comportamientos individuales y patrones que emergen a partir de la interacción entre los individuos y entre los diferentes niveles utilizados, facilitando de esta forma la exploración de comportamientos bajo diferentes microambientes y condiciones.

La herramienta de programación está escrita en Java: “NetLogo 5.3 (December 14, 2015). Extension API version: 5.0. Java HotSpot(TM) 64-Bit Server VM 1.8.0_65 (Oracle Corporation; 1.8.0_65-b17). operating system: Windows 10 10.0 (amd64 processor). Scala version 2.9.2. Java heap: used = 40 MB, free = 212 MB, max = 910 MB. JOGL: (3D View not initialized). OpenGL Graphics: (3D View not initialized)” (Wilensky, 1999). La siguiente información corresponde a sus derechos de autor.

Copyright Information

Copyright 1999-2008 by Uri Wilensky. All rights reserved.

The NetLogo software, models and documentation are distributed free of charge for use by the public to explore and construct models. Permission to copy or modify the NetLogo software, models and documentation for educational and research purposes only and without fee is hereby granted, provided that this copyright notice and the original author's name appears on all copies and supporting documentation. For any other uses of this software, in original or modified form, including but not limited to distribution in whole or in part, specific prior permission must be obtained from Uri Wilensky. The software, models and documentation shall not be used, rewritten, or adapted as the basis of a commercial software or hardware product without first obtaining appropriate licenses from Uri Wilensky. We make no representations about the suitability of this software for any purpose. It is provided "as is" without express or implied warranty.

To reference this software in academic publications, please use: Wilensky, U. (1999). NetLogo. <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL.

4.1.2. Descripción del prototipo

El prototipo correspondiente a “una aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus de papiloma humano tipo 16”, como agente etiológico de cáncer de cuello uterino, considera la interacción en tres (3) diferentes capas, que permiten involucrar componentes a nivel celular y molecular, los cuales representan tres (3) microambientes, en los que se simulan procesos biológicos específicos, que permiten representar las interacciones entre el desarrollo del virus de papiloma humano tipo 16, desde su condición de infección inicial y progresión, hasta desarrollo de cáncer cervical, y también su interacción con el sistema inmune, innato y adaptativo, del huésped.

Como tal, el ciclo de vida del virus de papiloma humano tipo 16, ha sido presentado previamente en (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013; Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010). Los antecedentes biológicos correspondientes a los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis celular frente al sistema inmune innato y adaptativo, son presentados en detalle en el libro anexo-1, capítulo I y en el libro anexo-2, capítulo III, los cuales son considerados en la implementación del primer nivel del prototipo. Los antecedentes biológicos correspondientes a receptores Toll-like (TLRs), son presentados en el libro anexo-1, capítulo II y en el libro anexo-2, capítulo IV, los cuales son considerados en la implementación del segundo nivel del prototipo. Los antecedentes biológicos correspondientes a Citoquinas, son presentados en el libro anexo-1, capítulo III y en el libro anexo-2, capítulo IV, los cuales son considerados en la implementación del tercer nivel del prototipo. Adicionalmente, los antecedentes relacionados con Vacunas, son presentados en el libro anexo-2, capítulo IV, numerales 4.6 y 4.7, los cuales son considerados en la implementación del microambiente externo. El concepto de vacunas, es implementado como un microambiente externo que interactúa con los tres (3) niveles previamente referidos. El ciclo de vida del virus HPV16 se modela bajo el concepto de autómatas celulares (CA), y los tres (3) niveles asociados al sistema inmune se modelan bajo el concepto de modelos basado en agentes (ABM). Las reglas que definen el comportamiento de los autómatas celulares, así como también los agentes, percepciones, sensores, actuadores, y acciones del ABM, interactuando con los microambientes establecidos, se detallan en el presente capítulo.

La interfaz gráfica construida muestra varios componentes, que permiten seguir el comportamiento de la interacción entre el virus y el huésped (ver [figura 4.1](#)).

El primer bloque de información dispuesto al costado izquierdo, consta de un deslizador que permite modificar la población de células progenitoras iniciales. A continuación se muestran tres (3) botones de comandos: “setup”, “go” (paso a paso) y “go” (indefinido). Posteriormente, se presentan ocho (8) interruptores que representan cada una de las proteínas involucradas en el ciclo de vida del HPV16, y dos (2) que corresponden a tipos de infección (natural y aguda). A continuación se presentan ocho (8) monitores que muestran el porcentaje de células que se encuentran expresando cada una de las proteínas virales. En la parte inferior del costado izquierdo de la interfaz, se encuentran tres (3) plotters que muestran la evolución de las poblaciones celulares que intervienen en el modelo.

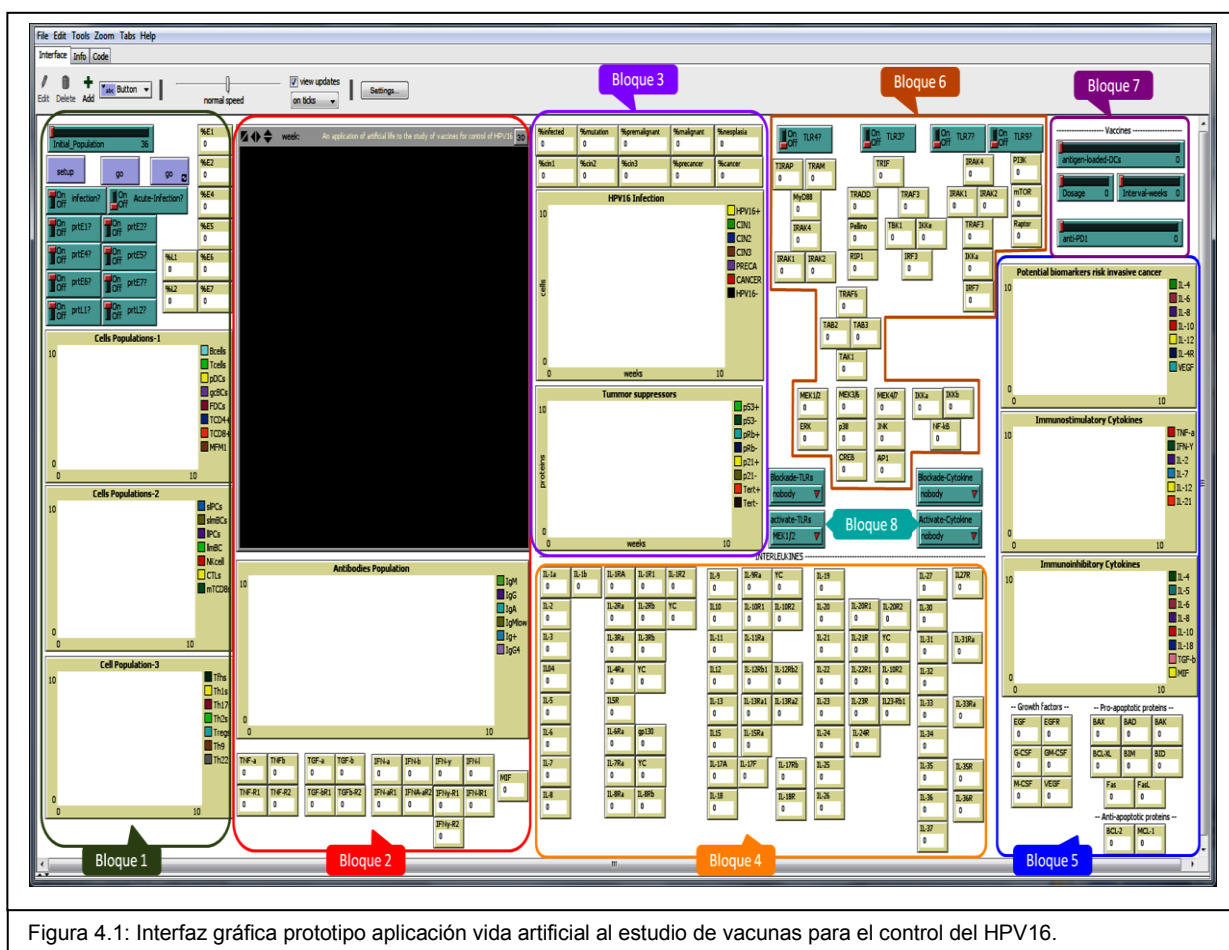


Figura 4. 1: Interfaz gráfica prototipo aplicación vida artificial al estudio de vacunas para el control del HPV16.

El segundo bloque de información (de izquierda a derecha), contiene el monitor principal en que se muestra el comportamiento de los microambientes definidos, donde las poblaciones celulares involucradas en el modelo, interactúan a través de sus diferentes procesos biológicos, y se ven afectadas por las interacciones que se dan entre poblaciones celulares que responden a estímulos generados por los diferentes TLRs, citoquinas y proteínas virales, expresadas en el entorno. Adicionalmente, se muestra un (1) plotter que permite seguir la tendencia de expresión de poblaciones de anticuerpos que resultan a partir de los procesos de defensa inmune, y dieciocho (18) monitores adicionales, que muestran los cambios de estado

que sufren las citoquinas que pertenecen a las familias TNF, TGF, IFNs y MIF, incluidos sus correspondientes receptores.

El tercer bloque de información (de izquierda a derecha), ubicado en la mitad superior de la interfaz, presenta varios monitores que muestran el desarrollo del proceso infeccioso ocasionado por HPV16. Diez (10) monitores que reportan el porcentaje de células que se encuentran infectadas por HPV16, y que alcanzan estados de mutación, pre-malignidad, malignidad, estados CIN (1-3), pre-cáncer y cáncer. Además, se muestran dos (2) plotters que permiten seguir la evolución de HPV16 en sus diferentes etapas de infección, y la tendencia que reportan los supresores de tumores *p53*, *pRb*, *p21* y *Tert*.

El cuarto bloque de información, ubicado en la mitad inferior de la interfaz, presenta setenta y ocho (78) monitores que reportan los cambios de estado que sufren las treinta y tres (33) interleuquinas y sus correspondientes receptores, a medida que el modelo evoluciona.

El quinto bloque de información, ubicado en el costado inferior derecho de la interfaz, está conformado por tres (3) plotters que muestran la tendencia con relación a ciertas citoquinas claves en el desarrollo de la enfermedad, seis (6) monitores que reportan los cambios de estado de factores de crecimiento, ocho (8) monitores que reportan el cambio de estado de proteínas pro-apoptóticas y dos (2) monitores adicionales que muestran el cambio de estado de proteínas anti-apoptóticas.

El sexto bloque de información, está conformado por treinta y cuatro (34) monitores que reportan los cambios que se generan en los diferentes componentes que hacen parte de las cascadas de señalización de los receptores Toll-like (TLRs), a medida que el modelo evoluciona. Adicionalmente, cuenta con cuatro (4) interruptores que le permiten al usuario intervenir la vía de señalización correspondiente a TLR3, TLR4, TLR7/TLR8 y TLR9, respectivamente.

El séptimo bloque, corresponde a las variables que pueden ser modificadas por el usuario, correspondientes a las vacunas de células dendríticas cargadas con antígeno o anti-PD1. Este bloque está conformado por cuatro (4) deslizadores que pueden ser modificados, previo a, o en tiempo de corrida.

El octavo bloque, muestra cuatro (4) botones selectores, que le permiten al usuario intervenir los estados de expresión o inhibición, de cada uno de los elementos que hacen parte de la vía de señalización TLRs y de cada una de las citoquinas y sus receptores.

El botón SETUP lee el valor por defecto o modificado por el usuario, correspondiente a la población inicial de células progenitoras, las cuales organiza de forma aleatoria en cada una de las regiones correspondientes a zona-T y zona-B. Las células se organizan además en una malla hexagonal, iniciando con células vivas y sanas. El primer botón GO, avanza el proceso de interacción, paso a paso, cada vez que sea pulsado por el usuario. El segundo botón GO, avanza el proceso de interacción de forma continua y solo se detendrá cuando el botón sea nuevamente pulsado o se especifique una pausa controlada por el código.

Las interacciones que surgen entre las diferentes poblaciones celulares son manejadas dentro del modelo como agentes, así como también los TLRs y las citoquinas. Considerando que el virus HPV16 afecta exclusivamente la población celular conformada por queratinocitos, tanto

las proteínas expresadas por el virus como los queratinocitos, son manejados como miembros de autómatas celulares controlados por listas específicas.

Tanto el rango de queratinocitos como el rango de proteínas, pueden variar entre uno (1) y seis (6), dado que los vecinos en cada caso se encuentran sobre una malla hexagonal, de tal forma que cada queratinocito y cada proteína pueden tener hasta seis (6) vecinos. Los queratinocitos se almacenan en una lista (elegibles) que contiene los números de las células de esta población, que se ven afectados por la expresión de las proteínas contenidas en la segunda lista (interruptores). Las listas se utilizan para verificar los vecinos correspondientes en cada caso y poder validar las opciones que se deriven de sus posibles interacciones.

4.1.2.1. Lógica implementada en el prototipo

La unidad de tiempo controlada en el modelo se representa por cada paso (tick) que corresponde a una semana (7 días).

Frente al ciclo de vida del HPV, el prototipo trabaja con dos (2) listas. Una que permite establecer cuáles de las células en el vecindario corresponden a queratinocitos (elegibles), y cuáles de las proteínas se expresan, sin que esta labor tenga que realizarse de forma individual. Cada vez que un queratinocito o proteína cambia de estado se verifica si debe ser adicionada o removida de su lista correspondiente.

El prototipo construido correspondiente al modelo denominado “aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus de papiloma humano tipo 16”, como agente etiológico de cáncer de cuello uterino (HPV16-ALIFE), responde a la siguiente lógica computacional.

Fase configuración. Incluye la definición de variables globales que conforma la totalidad de citoquinas, receptores, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, proteínas, quinasas, enzimas, marcadores de apoptosis, utilizadas por el modelo, inicialmente en un estado inactivo. Además, se configura la malla, segmentado las zonas según lo referido en este documento en el capítulo III, numeral 3.1.6.3_Paso 0_Preparar ambiente, donde se genera de forma aleatoria la población de células progenitoras en estado inactivo, las cuales son ubicadas en sus correspondientes zonas. Se valida también, que las células tengan el número de vecinos permitidos y se verifica el estado de los interruptores que representan las proteínas expresadas por el virus HPV16.

Fase de diferenciación, proliferación y apoptosis celular. El ciclo de procesamiento inicia con el microambiente celular, donde se realizan las actividades que a continuación se refieren, considerando el estado en que se encuentren las variables del microambiente, de acuerdo con lo explicado en los pasos 1 al 22 y 24 al 25, referidos en el capítulo III, numeral 3.1.6.3.1 del presente documento. Tienen lugar las siguientes etapas: activación de queratinocitos (paso-1), células presentadoras de antígenos (pasos 2-7, y 9.1-9.5), diferenciación de células-T foliculares (paso 8), proliferación de células-B (paso 9.6), diferenciación de células-B de corta vida (paso 10), respuesta del centro germinal (paso 11), secreción de anticuerpos a partir de células plasma de corta vida y secreción de anticuerpos a partir de células plasma de larga vida (paso 12), proliferación de nuevas células-B progenitoras (paso 13), diferenciación de nuevas células-T progenitoras (paso 14), interacciones entre DCs y células-T CD4+ (paso 15),

interacciones entre DCs y células-T CD8⁺ (paso 16), proliferación de células-T (paso 17), diferenciación células-T CD8 (paso 18), diferenciación de células-T ayudadoras (paso 19) (incluyendo Th1, Th2, Treg, Th17, Th9, Th22, Tfh, Treg), diferenciación de macrófagos (paso 20), proliferación de macrófagos (paso 21), mantenimiento de queratinocitos (paso 22), proliferación de células NKs (paso 24), y verificación de procesos de apoptosis en las diferentes poblaciones celulares (paso 25).

Fase de interacciones entre el microambiente celular y HPV16. A la par del proceso de diferenciación celular, también se ejecuta el desarrollo del ciclo de vida del HPV, según lo definido previamente en (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013; Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010). En esta fase, tienen lugar las interacciones entre la población de células NKs y células infectadas por HPV16, así como también las interacciones entre población CTLs y células infectadas por HPV16, considerando el estado en que se encuentren las variables del microambiente celular, según lo explicado en el paso 23 referido en el capítulo III, numeral 3.1.6.3.1 del presente documento.

Fase de interacciones en microambiente TLRs. En esta fase, el modelo verifica el estado de los interruptores que representan cada una de los TLRs implementados en el modelo, es decir, los interruptores correspondientes a TLR3, TLR4, TLR7/TLR8, y TLR9, de acuerdo con lo explicado en el paso 26, referido en el capítulo III, numeral 3.1.6.3.2 del presente documento.

De encontrarse activo el interruptor para TLR3, el modelo activa el ligando relacionado y procede a la activación de la correspondiente cascada de señalización, ejecutando las siguientes acciones. Inicialmente, se verifican las condiciones infecciosas en el microambiente. De cumplirse esta condición, se activa el adaptador TRIF. Luego se verifica el estado que reporta TNF- α y su receptor TNF-R1. De encontrarse habilitados, se activa TRADD, de lo contrario se genera una opción aleatoria mediante la cual se decide activar la vía TRAF3 o la vía TRAF6. Luego, se evalúa la simultaneidad en la activación de algunos componentes de la vía. Tales son los casos, si TRIF y TRADD se encuentran activos en simultánea, se desencadena la vía TRIF-TRADD; si TRIF y TRAF3 se encuentran activos en simultánea, se desencadena la vía TRIF-TRAF3; y si TRIF y TRAF6 si se encuentran activos en simultánea, se desencadena la vía-TRAF6.

Si se encuentra activo el interruptor TLR4, el modelo activa el ligando relacionado y procede a la activación de la correspondiente cascada de señalización, ejecutando las siguientes acciones. Se verifican las condiciones infecciosas en el microambiente. De cumplirse esta condición, se activa el adaptador MyD88. Encontrándose habilitado LPS, se activan los adaptadores TRAM y TIRAP, y se activan las quinasas ERKs. Posteriormente se evalúa la simultaneidad en la activación de algunos componentes de la vía. Si MyD88 y TIRAP se encuentran activos en simultánea, se activan IRAK4, IRAK2, IRAK1, TRAF6 y se desencadena la vía-TRAF6. Si TRAM y TRIF se encuentran activos, se genera una opción aleatoria que permite definir si se desencadena la vía TRIF-TRAF3 o la vía TRIF-TRADD.

De encontrarse activo el interruptor TLR7/TLR8 o el interruptor TLR9, el modelo activa el ligando relacionado y procede a la activación de la correspondiente cascada de señalización, ejecutando las siguientes acciones. Se verifican las condiciones infecciosas en el microambiente. De cumplirse esta condición, se activa el adaptador MyD88. Posteriormente, se activan las quinasas IRAK4, IRAK2, e IRAK1. Luego, el modelo genera una opción

aleatoria mediante la cual se decide activar una (1) de tres (3) posibles vías. Una opción, activa TRAF6 y desencadena luego la vía-TRAF6; otra opción, activa TRAF3 y desencadena la vía-IRF7; y la última opción, activa PI3K, Akt, mTOR, Raptor y desencadena la vía-IRF7.

Fase de interacciones en microambiente citoquinas. El modelo HPV16-ALIFE verifica el estado que reportan cada una de las cuarenta y ocho (48) citoquinas involucradas. De encontrarse en estado activo, se verifica el estado que reportan sus correspondientes receptores y dependiendo de la unión que se establezca (baja, media y alta afinidad), se desencadena la vía de señalización que corresponde a cada una de ellas. Se verifica también la coincidencia de la citoquina en evaluación frente a otras que se encuentren activas en simultánea en su entorno, verificando posibles activaciones, inhibiciones, desregulaciones o incrementos en su expresión. Además, se verifica la interacción de la citoquina en evaluación frente a las proteínas expresadas por el virus y las eventuales condiciones generadas por el proceso infeccioso a partir de HPV16.

Fase de control vacunas. En el prototipo desarrollado, cuando la vacuna es definida con antelación, esta fase se activa únicamente cuando el microambiente reporta una condición de cáncer en desarrollo. De activarse, se leen los parámetros definidos por el usuario, los cuales permiten establecer el tipo de vacuna entre células dendríticas cargadas con antígenos E6/E7 o anti-PD1, así como también la dosis, intervalo de tiempo medido en semanas entre la aplicación de una y otra dosis, variables que pueden ser planificadas y/o modificadas a través de cuatro (4) deslizadores disponibles en la interfaz gráfica de usuario.

Adicionalmente, se cuenta con opciones para bloquear o activar componentes específicos de las vías de señalización TLRs y de citoquinas, particulares. Estas opciones pueden ser intervenidas por el usuario a través de cuatro (4) botones selectores denominados: “*Blockade-TLR*”, “*Activate TLR*”, “*Blockade-Cytokine*”, “*Activate Cytokine*”. Al ser pulsado alguno de estos botones, se muestra una lista que contiene todos los posibles elementos que pueden ser alterados por decisión del usuario, cuyo valor será priorizado y los microambientes responderán ante este cambio externo.

El usuario también puede activar completamente las vías de señalización TLR3, TLR4, TLR7/TLR8, TLR9, activando los interruptores correspondientes, disponibles en la interfaz gráfica del usuario. Si bien el modelo tiene por defecto una condición de estado inactivo, los componentes que hacen parte de cada una de las vías, reporta si se encuentra activo o inactivo, como resultado de las interacciones que están teniendo lugar en los microambientes del modelo en tiempo de corrida. Al activarse alguno de los interruptores, se obliga la activación de la totalidad de componentes de su vía y los microambientes responderán ante este cambio externo.

4.1.2.1.1. Perspectiva externa

El modelo considera una perspectiva externa desde el punto de vista de la interacción que se observa entre el virus HPV16 y el sistema inmune del huésped, y adicionalmente, la interacción que se presenta posteriormente entre el sistema inmune y la vacuna.

En esta sección se describe el comportamiento de la interacción entre HPV16 y el huésped, como resultado de la relación estímulo – respuesta, el primero por parte del virus y el segundo

por parte del sistema inmune innato y adaptativo del huésped, antes de la infección, durante la infección y después de la infección.

Comportamiento antes de la infección. El virus se encuentra activo (HPV16+) pero no ha infectado aún los queratinocitos, razón por la cual no se obtiene una respuesta inmune efectiva (ver capítulo III, numeral 3.1.3.1).

Durante la infección. Se presenta una abrasión que le permite al virus infectar la capa basal de la epidermis y del epitelio de la mucosa, lo cual da inicio a la habilitación del ciclo de vida del HPV16 que desencadena en la activación de la maquinaria de replicación (ver antecedentes en el libro anexo-2). En esta etapa, el modelo reporta el incremento o disminución en la expresión de las proteínas vinculadas al virus y se muestra la tendencia en el comportamiento de la población celular, especialmente la observada en queratinocitos. La dinámica de este enfoque obedece al comportamiento del ciclo de vida del HPV, el cual se resume a continuación.

La unión de la proteína L1 de HPV16 y la superficie de los queratinocitos induce endocitosis del virión. Posteriormente se desensambla la cápside y luego el episoma viral se asocia con L2 para viajar al núcleo de la célula, donde se producen bajos niveles de proteínas tempranas. Proteínas E1 y E2, inician la replicación del episoma y, junto con la maquinaria de replicación DNA del huésped, mantiene un número bajo de copias del episoma por célula (entre cincuenta (50) y cien (100) por célula). Proteínas E6 y E7 también son producidas para prevenir la detención del crecimiento celular y la apoptosis. Adicionalmente, se inactivan las proteínas *p53* y *pRb* para retardar el proceso de diferenciación. Este ambiente induce los queratinocitos infectados en estado proliferativo, no diferenciado, hacia un proceso de división celular lateral. Una vez los queratinocitos infectados se diferencian, migran hacia las capas suprabasales del epitelio, donde se mejora la replicación del episoma, alcanzado un alto número de copias que pasa de cientos a miles, por célula. En las capas altas del epitelio, la producción de L1 y L2 forman la cápside viral y se da el ensamble del virión. Con el derramamiento y ruptura de los queratinocitos maduros, las partículas virales son liberadas. HPV16 se integra al genoma del huésped, y las células transformadas expresan E6 que se une a *p53* para conducir a su degradación, y E7 recluta *pRb* para conducir la degradación proteosomal. La pérdida de los supresores de tumores termina descontrolando el crecimiento celular, produce mutaciones en el genoma del huésped, genera inhibición de apoptosis, lo que en conjunto conduce a la formación de cáncer (Amador-Molina et al., 2013; Deligeoroglou et al., 2013; Stanley, 2012; Stanley, 2010; Stanley, 2008, Tummers et al., 2015).

Después de la infección. El sistema inmune del huésped responde, activando toda su maquinaria de defensa. En esta etapa, los queratinocitos expresan PRRs, tales como TLRs que reconocen PAMPs virales. El modelo activa la interacción entre PRRs y TLRs, que posteriormente induce la expresión de ciertas citoquinas, lo cual permite la activación de respuestas inmunes innatas y adaptativas (revisar antecedentes en libro anexo-1, capítulo II, numeral 2.6 y en el libro anexo-2, capítulo IV, numeral 4.5). En esta etapa, los tres (3) microambientes definidos en el modelo interactúan (capítulo III, numeral 3.1.2 del presente documento), lo cual conduce a la activación de procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis celular, y al desencadenamiento de señalización estimulada por TLRs y expresión de citoquinas. Adicionalmente, la expresión de las proteínas virales afecta el comportamiento de los tres (3) microambientes, a nivel celular, a nivel de TLRs y a nivel de citoquinas, produciéndose de esta forma ciclos de regulación positiva y negativa, según las variables del

entorno en un momento dado. La interfaz gráfica de usuario, reporta en cada momento los cambios que resultan de estas interacciones. Después de la infección, también se involucra la participación de las vacunas (capítulo III, numeral 3.1.6.3.4 del presente documento), que como variables externas definidas por el usuario, permiten modificar las condiciones de los microambientes intracelulares, y sus resultados se observan en el conjunto de herramientas que hacen parte de la interfaz gráfica implementada en el prototipo.

4.2.1.1.2. Propiedades dinámica global

Las propiedades de la dinámica global (**PDG**) que tienen lugar en el segundo nivel del modelo, considera tres (3) etapas. La primera etapa, corresponde al proceso de infección que ocurre como consecuencia del ingreso del virus, mediante abrasiones, a la capa basal; la segunda etapa, se presenta cuando la infección es detectada por los receptores TLR; y la tercera etapa, ocurre cuando el sistema inmune del huésped prepara respuestas inmunes inducidas por TLRs.

PDG1 (Infección por ingreso de HPV16 a la capa basal)

En cualquier punto en el tiempo, si el HPV16 ingresa a la capa basal de la epidermis y del epitelio de la mucosa, entonces los queratinocitos se infectarán.

PDG2 (Infección detectada por TLRs)

En cualquier punto en el tiempo, si la infección existe y los queratinocitos se encuentran infectados, se activará el proceso de detección a través de la activación de TLRs.

PDG3 (Preparar respuestas inmunes mediadas por TLRs)

En cualquier punto en el tiempo, si HPV16 ha infectado queratinocitos, y en cuatro (4) diferentes TLRs (TLR3, TLR4, TLR7/TLR8, TLR9), un TLR se activa, seguido de un adaptador afín, entonces se generará la activación de una vía de señalización.

4.1.2.1.3. Perspectiva interna TLRs

Esta perspectiva describe la respuesta inicial del sistema inmune del huésped frente a la detección de la infección por HPV16, la cual tiene lugar cuando los queratinocitos infectados expresan receptores Toll-like (TLRs), los cuales reconocen patrones moleculares asociados al patógeno, en este caso HPV16 (antecedentes biológicos en el libro anexo-2, capítulo IV, numeral 4.5.3, y en el presente documento en el capítulo III, numeral 3.1.4).

Considerando que esta perspectiva tiene lugar en el segundo nivel del modelo y éste se desarrolla bajo el concepto ABM (modelos basados en agentes), a continuación se explican las interacciones que allí tienen lugar.

Los queratinocitos infectados expresan TLR3 sobre su superficie y los receptores TLR3 en el endosoma los detectan. Además, el episoma contiene motivos CpG que pueden ser reconocidos por TLR9 (Tummers et al., 2015). El virus también puede ser detectado por sensores DNA citosólicos, tales como AIM2 e IFI16. La unión de DNA viral conduce a la liberación de IL-1 β e IL-18, mediados por inflamasoma AIM2, mientras que la activación de

IFI16 y TLR9 conduce a la liberación de IFN- β , con lo cual se hace el reconocimiento del virus y luego se activan células inmunes innatas y adaptativas (Reinholz et al., 2013). Esta interacción en el modelo HPV16-ALIFE, constituye la primera relación activa entre microambiente-percepción-sensor.

En este mismo entorno, los agentes representan cada uno de los receptores TLRs involucrados en el modelo, es decir, TLR3, TLR4, TLR7/TLR8 y TLR9 (antecedentes en libro anexo-2 capítulo II, numeral 2.2). Los actuadores del modelo en este nivel, corresponden a las moléculas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM (antecedentes en libro anexo-1, capítulo II, numeral 2.3). Las acciones a desarrollar incluyen la unión receptor-ligando y la activación de la vía de señalización correspondiente (antecedentes en libro anexo-1, numeral 2.4), las cuales conducen a la expresión de citoquinas y posterior retroalimentación a los microambientes definidos en el modelo conceptual (ver [figura 3.2](#)).

Los agentes TLRs pueden ser activados como resultado del proceso de detección del virus, o mediante la activación manual por parte del usuario, pulsando el botón correspondiente a cada uno de los receptores TLRs. A continuación se relacionan las acciones sobre los agentes en su dinámica normal.

Agentes TLRs activados al encontrar ligando mediado por detección del patógeno:

TLR3: Receptor Toll-like 3 es activado

TLR9: Receptor Toll-like 9 es activado

TLR7/TLR8: Es activado mediante la inducción de la unión de TLR3 con su ligando

TLR4: Se activa cuando encuentra su receptor y ligando activos.

Adaptadores TLRs:

MyD88: Adaptador usado por TLR4, TLR7/TLR8 y TLR9.

TRIF: Adaptador usado por TLR3 y TLR4.

TRAM: Adaptador usado por TLR4.

TIRAP: Adaptador usado por TLR4.

Las siguientes propiedades de estado interno son utilizadas, (agente + actuador) → Acción:

- Si el agente TLR3 y el adaptador TRIF se encuentran activos, se produce la habilitación de la vía de señalización TLR3.
- Si el agente TLR4 y los adaptadores MyD88, TIRAP, TRAM y TRIF se encuentran activos, se produce la habilitación de la vía de señalización TLR4.
- Si el agente TLR7/TLR8 y el adaptador MyD88 se encuentran activos, se produce la habilitación de la vía de señalización TLR7/TLR8.
- Si el agente TLR9 y el adaptador MyD88 se encuentran activos, se produce la habilitación de la vía de señalización TLR7/TLR9.

De encontrarse habilitada la vía TLR3, se ejecuta el paso 26.1; si la vía TLR4 es habilitada, se ejecuta el paso 26.2; y si las vías TLR7/TLR8 o TLR9 son habilitadas, se ejecuta el paso 26.3; los cuales se encuentran detallados en el capítulo III, numeral 3.1.6.3.2. Adicionalmente, estas acciones tienen en cuenta lo referido en el aparte “Fase de interacciones en microambiente TLRs”, descrito en el numeral 4.2.2.1 del presente capítulo.

4.1.2.1.4. Propiedades dinámica local en TLRs

Las propiedades de la dinámica local (**PDL**) que tiene lugar en el segundo nivel del modelo, considera cada uno de los adaptadores, los cuales una vez activos, producen una respuesta específica mediada por un proceso de señalización determinado.

PDL1 (Activación MyD88)

En cualquier punto del tiempo, si una TLR diferente de TLR3 se habilita, entonces se activa el adaptador MyD88.

PDL2 (Activación TRIF)

En cualquier punto del tiempo, si TLR3 se habilita, entonces se activa el adaptador TRIF.

PDL3 (Activación TRAM)

En cualquier punto del tiempo, si TLR4 se habilita, entonces se activa el adaptador TRAM.

PDL4 (Activación TIRAP)

En cualquier punto del tiempo, si TLR4 se habilita, entonces se activa el adaptador TIRAP.

PDL5 (Activación IRAKs)

En cualquier punto del tiempo, si la activación de MyD88 ocurre, entonces se activan las quinasas IRAK4, IRAK1 e IRAK2.

PDL6 (activación TRADD)

En cualquier punto del tiempo, si la activación de TLR3 ocurre, y la activación de TRIF ocurre, y la señal de TNF y su receptor TNF-R1 se encuentran activos, entonces se activa TRADD; de lo contrario, se genera una señal de fuerza "opcw", con $opcw < 2$ (aleatorio entre 0 y 1), entonces la señal más débil activa TRAF6 y la señal más fuerte activa TRAF3.

PDL7 (señalización vía-TLR3)

En cualquier punto del tiempo, si la activación de TLR3 ocurre, y la activación de TRIF ocurre, pueden activarse tres (3) posibles vías. (opción-1): si con lo anterior (PDL6), la activación de TRADD ocurre, entonces se habilita la vía-TRIF-TRADD; (opción-2): si con lo anterior (PDL6), la activación de TRAF3 ocurre, se habilita la vía TRIF-TRAF3; (opción-3): si con lo anterior (PDL6), la activación de TRAF6 ocurre, se habilita la vía-TRAF6.

PDL8 (señalización vía-TLR4)

En cualquier punto del tiempo, si la activación de TLR4 ocurre, pueden activarse varias posibles vías. (opción-1): si con lo anterior (pasos previos), la activación de TIRAP ocurre, y la activación de MyD88 ocurre, y la activación de IRAKs ocurre, entonces se activa la vía-TRAF6; (opción-2): si con lo anterior, la activación de TRAM ocurre, y la activación de TRIF ocurre, entonces se genera una señal de fuerza "opcw", con $opcw < 3$ (aleatorio entre 0 y 2), con lo cual la señal más débil ($opcw=0$) habilita la vía TRIF-TRADD, la señal intermedia ($opcw=1$) habilita la vía TRIF-TRAF3, y la señal más fuerte ($opcw=2$) habilita la vía-TRAF6.

PDL9 (señalización vía-TLR7/TLR9)

En cualquier punto del tiempo, si la activación de TLR7 o TLR9 ocurre, y la activación de MyD88 ocurre, entonces se genera una señal de fuerza "opcw", con $opcw < 3$ (aleatorio entre 0 y 2), con lo cual la señal más débil ($opcw=0$), activa la vía PI3K-Akt-mTOR-Raptor y habilita

la vía-IRF7; la señal intermedia ($opcw=1$), activa TRAF6 y habilita la vía-TRAF6; y la señal más fuerte ($opcw=2$), activa TRAF3 y habilita la vía-IRF7.

PDL10 (activación vía-TRIF-TRADD)

En cualquier punto del tiempo, si la habilitación TRIF-TRADD ocurre, entonces se activa RIP1 y TRAF6 y se habilita la vía-TRAF6.

PDL11 (activación vía TRIF-TRAF3)

En cualquier punto del tiempo, si la habilitación de la vía TRIF-TRAF3 ocurre, entonces se activan TANK, TBK1, IKK ϵ , IRF3, y luego se habilita expresión de IFN- β e IL-12p35.

PDL12 (activación vía-TRAF6)

En cualquier punto del tiempo, si la habilitación de la vía-TRAF6 ocurre, entonces se activan TAB2, TAB3, TAK1 y se genera una señal de fuerza “ $opcw$ ”, $opcw < 2$ (aleatorio entre 0 y 1), con lo cual la señal más débil ($opcw=0$) habilita la vía-NEMO, y la señal más fuerte ($opcw=1$) habilita la vía-MAPK.

PDL11 (activación vía-NEMO)

En cualquier punto del tiempo, si la habilitación de la vía-NEMO ocurre, y el regulador negativo UCHL1 se encuentra inhabilitado, entonces se activan IKK α , IKK β , I κ B, NF- κ B y se habilita la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-12p40 y TNF- α .

PDL12 (activación vía-MAPKs)

En cualquier punto del tiempo, si la habilitación de la vía-MAPK ocurre, entonces se genera una señal de fuerza “ $opcw$ ”, $opcw < 3$ (aleatorio entre 0 y 2), con lo cual la señal más débil ($opcw=0$), activa MEK47, JNK, $p53$, $p21$; la señal intermedia ($opcw=1$), activa MEK12, ERK y habilita la expresión de IL-23p19, IL-4 e IL-4Ra; y la señal más fuerte ($opcw=2$), activa MEK3-6, $p38$ y habilita la expresión de IL-10, IL-12, IL-18, IFN- γ .

PDL13 (activación vía-IRF7)

En cualquier punto del tiempo, si la habilitación de la vía-IRF7 ocurre, entonces se activa IKK α , IRF7 y se habilita la expresión de IFN- α e IL-12p35.

4.1.2.1.5. Perspectiva interna Citoquinas

Esta perspectiva describe la respuesta inicial del microambiente de citoquinas, que corresponde al tercer nivel del modelo, el cual recibe la influencia desde el microambiente de TLRs (segundo nivel) y del microambiente celular (primer nivel) (antecedentes en libro anexo 1, capítulo III; en el libro anexo-2, capítulo IV; y en el presente documento en el capítulo III, numerales 3.1.2.3, 3.1.4.1 y 3.1.6.3.3).

Las vías de señalización TLRs habilitan la expresión de algunas citoquinas y también lo hacen algunas poblaciones celulares, con lo cual el estado inicial que se recibe en este microambiente es habilitado o inhabilitado, y dependiendo de las interacciones que controla este entorno podrán resultar activadas, inactivadas, con expresión incrementada, disminuida o bloqueada por algunos eventos, entre los cuales cuentan algunas moléculas que actúan como reguladores negativos. Adicionalmente, algunas proteínas HPV16 tienen efectos sobre la señalización de algunas citoquinas, tanto positivos como negativos.

En este microambiente, los agentes representan cada una de las citoquinas incluidas en los cinco (5) grupos previamente definidos: TNFs, TGFs, IFNs, MIF e ILs (antecedentes en libro anexo-1, capítulo III). Los actuadores del modelo en este nivel corresponden a los complejos de receptores afines a cada citoquina. Las acciones a desarrollar incluyen la unión entre la citoquina y sus receptores, y la activación de las vías de señalización correspondientes, las cuales retroalimentan los microambientes definidos en el sistema y pueden influir en el ciclo de vida del HPV16 (ver [figura 3.2](#)).

Las vías de señalización de las citoquinas han sido consultadas principalmente en (eBioscience, 2015; Invivogen, 2015; Qiagen, 2015; R&D Systems, 2015, además de otras publicaciones reportadas en las referencias). A continuación se relacionan las acciones sobre los agentes citoquinas en su dinámica normal.

Agentes citoquinas que pueden ser habilitados en microambiente TLRs y/o microambiente celular:

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alpha habilitado

TNF- β : Factor de necrosis tumoral beta habilitado

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral beta habilitado

IFN- α : Interferon alpha habilitado

IFN- β : Interferon beta habilitado

IFN- γ : Interferon gamma habilitado

IFN- λ : Interferon lambda habilitado

MIF: Factor inhibidor de migración macrófaga habilitado

ILs: Interleuquinas habilitadas (IL-1-IL-13, IL-15, IL-17-IL-37)

Adaptadores citoquinas:

TNF-R: complejo receptor conformado por TNF-R1 y TNF-R2.

TGF-R: complejo receptor conformado por TGF-bR1 y TGF-bR2.

IFN-R: complejos receptores conformados por IFN-AR1 e IFN-AR2, IFN-GR1 e IFN-GR2, IFN-LR1 e IL-10R2.

MIF-R: complejo receptor conformado por Adaptador usado por CD74, CXCR2 y CXCR4.

ILs-R: complejo receptor conformado por dos (2) o tres (3) receptores según sea el caso con cada interleuquina en evaluación. Por ejemplo, para IL-2, el complejo está conformado por IL-2R, IL-2Rb y cadena yc. No obstante, cada interleuquina es un caso particular que es considerado en el modelo de forma independiente.

La siguiente propiedad de estado interno es utilizada: (agente-citoquina + actuador) → Acción:

- Si el agente-citoquina y los adaptadores específicos se encuentran habilitados, se realiza la unión, se realiza la activación de los componentes asociados y se habilita la vía de señalización correspondiente.

De encontrarse en estado activo la vía TNF, se ejecuta el paso 27.1; si la vía TGF se encuentra activa, se ejecuta el paso 27.2; si la vía IFNs se encuentra activa, se ejecuta el paso 27.3; si la vía MIF se encuentra activa, se ejecuta el paso 27.4; si alguna de las interleuquinas se activa, se ejecuta el paso 27.5; pasos que se encuentran detallados en el capítulo III, numeral 3.1.6.3.3. Adicionalmente, estas acciones tienen en cuenta lo referido en el aparte “Fase de interacciones en microambiente citoquinas”, descrito en el numeral 4.1.2.1 del presente capítulo.

4.1.2.1.6. Propiedades dinámica local en Citoquinas

Las propiedades de la dinámica local (**PDL**) que tiene lugar en el tercer nivel del modelo, considera cada uno de los adaptadores, y en este caso también los receptores, correspondientes a cada una de las citoquinas, que luego de su unión desencadenan la activación de un proceso de señalización específico.

A continuación se detallan las propiedades de la dinámica implementada en cada uno de los cinco (5) grupos de citoquinas consideradas en el prototipo de vida artificial.

PDL14 (activación TNFs)

Esta sección corresponde a la verificación del estado que reportan los factores de necrosis tumoral.

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de TNF- α ocurre, y la activación del receptor TNF-R1 ocurre, entonces se activan TRADD, FADD, RIP1, caspasa-8, TAK1, TRAF2, MEK12, y se habilita la vía-APOPTOSIS y se habilita la vía TRAF2-MEK12.
- Si la activación de TNF- α ocurre, y la activación de TNF- β ocurre, y la activación del receptor TNF-R2 ocurre, entonces se activan TRAF3, TRAF2, RIP1 y se habilita la vía-NIK. Adicional a lo anterior, si existe una condición de cáncer por HPV16, se activa TRAF2.
- Si la activación de TNF- α ocurre, entonces se habilitan las citoquinas IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-18, IL-36, IL-37, MIF, la enzima COX2 y la quinasa ERK.
- Si la activación de TNF- β ocurre, entonces se habilita la molécula ICAM1.

PDL15 (activación TGFs)

Esta sección corresponde a la verificación del estado que reporta el factor de crecimiento tumoral.

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de TGF- β ocurre, y la activación del receptor TGF-bR2 ocurre, entonces se activa el receptor TGF-bR1, y se habilitan PI3K, Akt, TAK1, MEK47, JNK, cJun.
- Si la activación de TGF- β ocurre, y la activación del receptor TGF-bR1 ocurre, entonces se activan TAK1, TAB1, MEK36, p38, ATF2, MEK47, JNK, cJun, cFos, PI3K, Akt, SMAD2, SMAD3, SMAD4, PP2A.
- Si la activación de TGF- β ocurre, entonces se habilitan las citoquinas IL-10, IL-37 y MIF, y se inhiben IL-2, IL-12, IL-31 e IFN- γ .
- Si la activación de TGF- β ocurre, y la activación de IL-1 β ocurre, entonces se habilita IL-11.
- Si la activación de TGF- β ocurre, y la activación del receptor TGF-bR1 ocurre, y la activación del receptor TGF-bR2 ocurre, y existe una condición de cáncer por HPV16, entonces se activan SMAD2, SMAD3, SMAD4.

PDL16 (activación IFNs)

Esta sección corresponde a la verificación del estado que reportan los interferones.

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IFN- α ocurre, y la activación de IFN- β ocurre, y la activación del receptor IFN-AR1 ocurre, y la activación del receptor IFN-AR2 ocurre, entonces se activan JAK1, TYK2, STAT1, STAT2, IRF9, PI3K, mTOR, MEK36, p38, CREB.
 - Si la activación de IFN- γ ocurre, y la activación del receptor IFN-gR1 ocurre, y la activación del receptor IFN-gR2 ocurre, entonces se activan JAK1, JAK2, PI3K, STAT1W.
-

- Si la activación de IFN- λ ocurre, y la activación del receptor IFN-LR1 ocurre, entonces se activan TYK2, STAT1.
- Si la activación de IFN- λ ocurre, y la activación del receptor IFN-10R2 ocurre, entonces se activan JAK1, STAT2, STAT1.
- Si la activación de IFN- γ ocurre, y la activación de IL-15 ocurre, entonces se habilita IL-12.
- Si la activación de IFN- γ ocurre, y la activación de LPS ocurre, entonces se habilita el receptor IL-31Ra.
- Si la activación de IFN- α ocurre, entonces se habilitan las citoquinas IL-6, TNF- α , los receptores IL-1R1, IL-1R2, IL-2Ra, IL-2Rb, IL-4Ra, IL-18R, IFN- γ .
- Si la activación de IFN- α o IFN- β , ocurre entonces se deshabilita la citoquina IL-12.
- Si la activación de IFN- α e IFN- β ocurre, entonces se habilita IFN- λ .
- Si la activación de IFN- γ ocurre, entonces se habilitan las citoquinas IL-3, IL-37, MIF, el receptor IL-22R1, la enzima COX2, y se deshabilitan IL-2, IL-18 y TGF- β .
- Si la activación de TGF- β ocurre, y la activación del receptor TGF-bR1 ocurre, y la activación del receptor TGF-bR2 ocurre, y existe una condición de cáncer por HPV16, entonces se activan SMAD2, SMAD3, SMAD4.

PDL17 (activación MIF)

Esta sección corresponde a la verificación del estado que reporta el factor inhibidor de migración macrófaga.

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de MIF ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ , y se bloquea p53.
- Si la activación de MIF ocurre, y existe una condición de cáncer por HPV16, entonces se activan PI3K, Akt.

PDL18 (activación interleuquinas)

Esta sección corresponde a la verificación del estado que reportan las treinta y tres (33) interleuquinas (ILs) incorporadas al modelo de vida artificial.

PDL18.1 (activación IL-1)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-1 α ocurre, y la activación de IL-1 β ocurre, y la activación del receptor IL-1R1 ocurre, y la activación del receptor IL-1RA ocurre, entonces se activan MyD88, el complejo IRAKs, TRAF6 y se habilita la vía-TRAF6.
- Si la activación de IL-1 β ocurre, y la activación del receptor IL-1RA ocurre, entonces se bloquea VEGF.
- Si la activación de IL-1 α o la activación de IL-1 β ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-6, IL-18, IL-36.
- Si la activación de IL-1 β , entonces se habilita la expresión de IL-37.
- Si la activación del receptor IL-1RA ocurre, entonces se deshabilita la expresión de IL-1 α , IL-1 β .

PDL18.2 (activación IL-2)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-2 ocurre, y la activación del receptor IL-2Ra ocurre, entonces se activa JAK1.
 - Si la activación de IL-2 ocurre, y la activación del receptor IL-2Rb ocurre, entonces se activan JAK3, STAT5.
-

- Si la activación de IL-2 ocurre, y la activación del receptor IL-2Rb ocurre, y la activación de IL-2Rg ocurre, entonces se activan PI3K, Akt, IKK α , IKK β , NF-kB.
- Si la activación de IL-2 ocurre, entonces se habilita la expresión de la citoquina IL-5.
- Si la activación de IL-2 ocurre, y la activación del receptor IL-2RA ocurre, y la activación del receptor IL-2Rb ocurre, entonces se bloquea la expresión de IL-2.

PDL18.3 (activación IL-3)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-3 ocurre, y la activación del receptor IL-3Ra ocurre, entonces se activa JAK2.
- Si la activación de IL-3 ocurre, y la activación del receptor IL-3Rb ocurre, entonces se activan STAT1, STAT3, STAT5 y STAT6.
- Si la activación de IL-3 ocurre, y la activación del receptor IL-3Ra ocurre, y la activación del receptor IL-3Rb ocurre, entonces se activan PI3K, Akt, IKK α , IKK β , NF-kB.
- Si existe una condición de cáncer por HPV16, entonces se activa IL-3.

PDL18.4 (activación IL-4)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-4 ocurre, y la activación del receptor IL-4Ra ocurre, entonces se activa JAK1.
- Si la activación de IL-4 ocurre, y la activación del receptor IL-4Rg ocurre, entonces se activa JAK3.
- Si la activación de IL-4 ocurre, y la activación del receptor IL-4Ra ocurre, y la activación de IL-4Rg ocurre, entonces se activan PI3K, Akt.
- Si la activación de IL-4 ocurre, entonces se inhibe la expresión de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-12, IL-37.
- Si la activación de IL-4 ocurre, y la activación de TNF- α ocurre, entonces se activa VCAM y se bloquea E-selectin.

PDL18.5 (activación IL-5)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-5 ocurre, entonces se activa MIF.

PDL18.6 (activación IL-6)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-6 ocurre, y la activación del receptor gp130 ocurre, entonces se activan JAK3, PI3K, Akt, IKK α , IKK β , NF-kB.
 - Si la activación de IL-6 ocurre, y la activación del receptor gp130 ocurre, y la activación del receptor IL-6Ra ocurre, entonces se activan JAK1, JAK2, STAT1, STAT3, SOCS.
 - Si la activación de IL-6 ocurre, entonces se habilita la expresión de citoquinas IL-2, IL-10, IL-18, IL-21, receptor IL-2Ra, moléculas ICAM1, VCAM; y se inhibe la expresión de IFN- γ , GM-CSF.
 - Si la activación de IL-6 ocurre, y la activación de TNF- α ocurre, y la activación de IL-1 β ocurre, entonces se inhibe la expresión de TNF- α .
 - Si la activación de IL-6 ocurre, y la activación de IL-7 ocurre, y la activación de IL-15 ocurre, entonces se habilita la proliferación de células-T CD8.
 - Si existe condición de cáncer por HPV16, y la activación de IL-6 ocurre, y la activación del receptor gp130 ocurre, entonces se activan JAK3, PI3K, Akt.
-

- Si existe condición de cáncer por HPV16, y la activación de IL-6 ocurre, y la activación del receptor IL-6Ra ocurre, entonces se activan JAK1, STAT1, STAT3.

PDL18.7 (activación IL-7)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-7 ocurre, y la activación del receptor IL-7Ra ocurre, entonces se activa JAK1.
- Si la activación de IL-7 ocurre, y la activación del receptor IL-7Ra ocurre, entonces se activa JAK3.
- Si la activación de IL-7 ocurre, y la activación del receptor IL-7Ra ocurre, y la activación del receptor IL-7Ra ocurre, y la activación de CD132 ocurre, entonces se activan STAT1, STAT3, STAT5, PI3K, Akt, se activan las proteínas BCL2, MCL1, y se inhiben BAX, BIM, BAD.

PDL18.8 (activación IL-8)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-8 ocurre, y la activación del receptor IL-8Ra (CXCR1) ocurre, y la activación del receptor IL-8Rb (CXCR2) ocurre, entonces se activan PI3K, Akt.
- Si la activación de IL-8 ocurre, y la infección por HPV16 ocurre, entonces se activan MMP2 y MMP.

PDL18.9 (activación IL-9)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-9 ocurre, y la activación del receptor IL-9Ra ocurre, entonces se activa JAK1.
- Si la activación de IL-9 ocurre, y la activación de CD132 ocurre, entonces activa se activa JAK3, PI3K, Akt.
- Si la activación de IL-9 ocurre, y la activación del receptor IL-9Ra ocurre, y la activación de CD132 ocurre, entonces se activan STAT1, STAT3, STAT5, SOCS3.
- Si la activación de IL-9 ocurre, entonces se inhibe la expresión de las citoquinas IFN- γ , IL-27 y se promueve la proliferación de células-T CD8.

PDL18.10 (activación IL-10)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-10 ocurre, y la activación del receptor IL-10R1 ocurre, entonces se activan PI3K, Akt, STAT3, SOCS3, Bcl-XL.
 - Si la activación de IL-10 ocurre, y la activación del receptor IL-10R2 ocurre, entonces se activan TYK2, STAT3, SOCS3, Bcl-XL.
 - Si la activación de IL-10 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-1RA, IL-18, TGF- β , TNF-R1, iNOS; y se inhibe la expresión de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-24, GM-CSF, VEGF.
 - Si la activación de IL-10 ocurre, y la inhibición de IL-1 α ocurre, y la inhibición de IL-1 β ocurre, entonces se activan COX2, PGE2.
 - Si la activación de IL-10 ocurre, y la activación del receptor IL-10R1 ocurre, y la activación del receptor IL-10R2 ocurre, y una condición de cáncer ocurre, entonces se activan JAK1, TYK2, STAT3.
-

PDL18.11 (activación IL-11)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-11 ocurre, y la activación del receptor IL-11Ra ocurre, y la activación de gp130 ocurre, entonces se activan JAK2, STAT1, STAT3.
- Si la activación de IL-11 ocurre, entonces se activan las citoquinas IL-4, IL-10, se inhiben IL-1 α , IL-1 β , IL-12.
- Si la activación de IL-11 ocurre, y la activación de IL-4 ocurre, y la activación de IL-6 ocurre, entonces se inhibe la expresión de IL-11.
- Si la activación de IL-11 ocurre, y la activación de LPS ocurre, entonces se inhibe la expresión de IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TNF- α .

PDL18.12 (activación IL-12)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-12 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb1 ocurre, entonces se activa JAK2.
- Si la activación de IL-12 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb2 ocurre, entonces se activa TYK2.
- Si la activación de IL-12 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb1 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb2 ocurre, entonces se activan STAT1, STAT3, STAT4, STAT5.
- Si la activación de IL-12 ocurre, entonces se habilita la expresión de IFN- γ , IL-2Ra, IL-2Rb, IL-18R, p53, FasL.
- Si la activación de IL-12 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb1 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb2 ocurre, y existe una condición de cáncer por HPV16, se activan TYK2, JAK2, STAT4, y se inhibe la expresión de VEGF.
- Si la activación de IL-12 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb1 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb2 ocurre, y existe una condición de cáncer por HPV16, y la activación de PGE2 ocurre, entonces se inhibe la expresión de IL-12.

PDL18.13 (activación IL-13)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-13 ocurre, y la activación del receptor IL-4Ra ocurre, entonces se activan JAK1, STAT6.
- Si la activación de IL-13 ocurre, y la activación del receptor IL-13Ra1 ocurre, entonces se activan JAK2, TYK2.
- Si la activación de IL-13 ocurre, y la activación del receptor IL-13Ra2 ocurre, entonces se activa ERK y se habilita la expresión de TGF- β .
- Si la activación de IL-13 ocurre, entonces se inhibe la expresión de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α .

PDL18.14 (activación IL-15)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-15 ocurre, y la activación del receptor IL-15Ra1 ocurre, y la activación del receptor IL-15Rb ocurre, entonces se activan JAK1, JAK3, PI3K, Akt.
 - Si la activación de IL-15 ocurre, y la activación del receptor IL-15Ra1 ocurre, y la activación del receptor IL-15Rb ocurre, y la activación de CD132 ocurre, entonces se activan JAK1, JAK3, STAT3, STAT5.
-

PDL18.15 (activación IL-17)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-17A ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-6, IL-11, GM-CSF.
- Si la activación de IL-17F ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TGF- β , GM-CSF.
- Si la activación de IL-17A ocurre, y la activación de IL-17F ocurre, y la activación del receptor IL-17R ocurre, y existe una condición de cáncer por HPV16, entonces se activa TRAF6.

PDL18.16 (activación IL-18)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-18 ocurre, y la activación del receptor IL-18Ra ocurre, y la activación del receptor IL-18Rb ocurre, entonces se activan MyD88, IRAK4, IRAK2, IRAK1.
- Si la activación de IL-18 ocurre, y la activación de IL-2 ocurre, entonces se habilita la expresión de IFN- γ .
- Si la expresión de IL-18 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-8, IL-37, GM-CSF, TNF- α , y se inhibe la expresión de IL-1 β .

PDL18.17 (activación IL-19)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-19 ocurre, y la activación del receptor IL-20R1 ocurre, y la activación del receptor IL-20R2 ocurre, entonces se activan STAT1, STAT3.
- Si la activación de LPS ocurre, y la activación de GM-CSF ocurre, y la activación de IL-4 ocurre, y la activación de IL-13 ocurre, y la inhibición de IFN- γ ocurre, entonces se activa y sobreexpone la expresión de IL-19.

PDL18.18 (activación IL-20)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-20 ocurre, y la activación del complejo receptor IL-20R1 e IL-20R2 ocurre, y la activación del complejo receptor IL-22R1 e IL-20R2 ocurre, entonces se activan STAT1, STAT3.
- Si la activación de IL-20 ocurre, y la activación de NF- κ B ocurre, y la activación de AP-1 ocurre, entonces se activan MMP2 y MMP9.
- Si la activación de LPS ocurre, se habilita la expresión de IL-20.

PDL18.19 (activación IL-21)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-21 ocurre, y la activación del receptor IL-21R ocurre, entonces se activan JAK1, PI3K, Akt, y se inhibe BAD.
- Si la activación de IL-21 ocurre, y la activación de CD132 ocurre, entonces se activan JAK3, MEK12, ERK.
- Si la activación de IL-21 ocurre, y la activación del receptor IL-21R ocurre, y la activación de CD132 ocurre, entonces se activan STAT1, STAT3 y STAT5.
- Si la activación de IL-21 ocurre, entonces se habilita la expresión del receptor IL-23R.

PDL18.20 (activación IL-22)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-22 ocurre, y la activación del receptor IL-22R1 ocurre, entonces se activan JAK1, STAT1, STAT3, STAT5, SOCS3.
-

- Si la activación de IL-22 ocurre, y la activación del receptor IL-10R2 ocurre, entonces se activan TYK2, STAT1, STAT3, STAT5, SOCS3, *p38*.
- Si la activación de IL-22 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-1 β , IL-6, G-CSF.
- Si la activación de LPS ocurre, entonces se activa la expresión de IL-22.

PDL18.21 (activación IL-23)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-23 ocurre, y la activación del receptor IL-23Ra ocurre, entonces se activan JAK2, STAT1, STAT3.
- Si la activación de IL-23 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb1 ocurre, entonces se activan TYK2, STAT4, STAT5.
- Si la activación de IL-23 ocurre, y la activación del receptor IL-23Ra ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb1 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-21, IL-23R, IL-17.
- Si la activación de IL-23 ocurre, y la activación de IL-23p19 ocurre, y la activación de IL-12p40 ocurre, y existe una condición de cáncer por HPV16, entonces se activan TYK2, JAK2, STAT3, STAT4.

PDL18.22 (activación IL-24)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-24 ocurre, y la activación del complejo receptor IL-22R1 e IL-20R2 ocurre, y la activación del complejo receptor IL-20R1 e IL-20R2 ocurre, entonces se activan JAK2, STAT1, STAT3, SOCS3.
- Si la activación de IL-24 ocurre, entonces suprime la expresión de iNOS.

PDL18.23 (activación IL-25)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-25 ocurre, y la activación del complejo receptor IL-17Ra e IL-17Rb, entonces se activa TRAF3.

PDL18.24 (activación IL-26)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-26 ocurre, y la activación del complejo receptor IL-20R1 e IL-10R2 ocurre, entonces se activan TYK2, JAK1, STAT1, STAT3, ERK.

PDL18.25 (activación IL-27)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-27 ocurre, y la activación del receptor IL-27Ra (WSX-1) ocurre, entonces se activa JAK1.
 - Si la activación de IL-27 ocurre, y la activación de gp130 ocurre, entonces se activan JAK1, JAK2, STAT4, STAT5.
 - Si la activación de IL-27 ocurre, y la activación del receptor IL-27Ra (WSX-1) ocurre, y la activación de gp130 ocurre, entonces se activan TYK2, STAT1, STAT3, T-bet.
 - Si la activación de IL-27 ocurre, entonces se habilita la expresión de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-21, IL-34, y se inhibe la expresión de IL-2, IL-17, VEGF, MMP9.
 - Si la activación de IL-27 ocurre, y existe una condición de cáncer por HPV16 en el entorno, entonces se inhibe la expresión de COX2, PGE2.
-

PDL18.26 (activación IL-30)

En cualquier punto del tiempo,

Si la activación de IL-30 ocurre, y la activación de gp130 ocurre, entonces se inhibe la expresión de las citoquinas IL-6, IL-11, IL-27.

PDL18.27 (activación IL-31)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-31 ocurre, y la activación de IL-31Ra ocurre, y la activación del receptor OSMR ocurre, entonces se activan JAK1, JAK2, STAT3, STAT5, PI3K, Akt.
- Si la activación de IL-31 ocurre, y la activación de IL-4 ocurre, y la activación de IL-13 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-6, IL-8 y VEGF.

PDL18.28 (activación IL-32)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-32 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , NF-kB.
- Si a activación de IL-32 ocurre, y existe una condición de cáncer por HPV16 en el entorno, entonces se inhibe la expresión de COX-2 y de la proteína E7.

PDL18.29 (activación IL-33)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-33 ocurre, y la activación de IL-1R1 ocurre, entonces se activan MyD88, IRAK4, IRAK2, IRAK1, TRAF6.
- Si la activación de IL-33 ocurre, y la activación de IL-4 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-31.
- Si la activación de IL-33 ocurre, y la inhibición de IL-12 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-6.
- Si la expresión de IL-33 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-13, TNF- α , IFN- γ .

PDL18.30 (activación IL-34)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-34 ocurre, y existe una condición infecciosa por HPV16 activa en el entorno, entonces se inhibe la expresión de IL-22.

PDL18.31 (activación IL-35)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-35 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb2 ocurre, entonces se activa JAK2.
 - Si la activación de IL-35 ocurre, y la activación de gp130 ocurre, entonces se activan JAK1, JAK2, STAT1, STAT3, STAT4.
 - Si la activación de IL-35 ocurre, y la activación del receptor IL-12Rb2 ocurre, y la activación de gp130 ocurre, entonces se activan STAT1, SAT4, IL-12p35.
 - Si existe una condición de cáncer por HPV16 en el entorno, entonces se activa la expresión de IL-35.
-

PDL18.32 (activación IL-36)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-36 ocurre, y la activación del complejo receptor IL-36R (alpha, beta y gamma) ocurre, entonces se activan JNK, AP-1, IKK α , IKK β , NF-kB.
- Si la activación de IL-36 ocurre, entonces se habilita la expresión de IL-2, IL-4, IL-17, IFN- γ .
- Si la activación de Poly [I:C] ocurre, entonces se activa la expresión de IL-36.

PDL18.33 (activación IL-37)

En cualquier punto del tiempo,

- Si la activación de IL-37 ocurre, se habilita la expresión de IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF- α .
- Si la activación de LPS ocurre, entonces se activa la expresión de IL-37.

4.1.2.1.7. Propiedades de estado microambiente externo

En el prototipo desarrollado, el microambiente externo independiente de agentes, está representado por un conjunto de interruptores, deslizadores y selectores que permiten modificar el entorno, dirigidos principalmente al control de la población inicial y al control de vacunas, los cuales pueden ser observados en la [figura 4.1](#), sobre los bloques 1, 7 y 8, específicamente.

Antes de iniciar el proceso de simulación, se cuenta con un deslizador que permite definir la población de células progenitoras iniciales, con base en el cual se generarán los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis celular. En tiempo de preparación o de corrida, se cuenta con deslizadores, que permiten definir variables necesarias para simular la aplicación de vacunas con carga de antígenos, dosis y frecuencia programados por el usuario, y selectores que permiten modificar la actividad o inactividad de algunos de los componentes que hacen parte de las señales de respuesta del sistema inmune simulado.

Los deslizadores permiten variar entre un rango mínimo y un rango máximo, presentando como valor por defecto el rango mínimo. Si el usuario no modifica estos deslizadores, la simulación se realizará con los valores mínimos establecidos por defecto. Los selectores permiten elegir un componente específico, indicando si se desea mantener en estado activo o inactivo, con el fin de observar los efectos que esta modificación produce a los microambientes internos establecidos en el modelo e incorporados al prototipo.

4.1.2.1.8. Propiedades de estado sensores de agentes

En general, los agentes definidos en el prototipo cuentan con sensores que pueden reportar en cualquier punto del tiempo, uno (1) de tres (3) posibles estados, los cuales serán determinados por las interacciones que se generan en los tres (3) niveles del modelo. Estos posibles estados son: “activo”, “inactivo”, “unión”. El estado “inactivo” significa que el agente no está en condiciones de realizar ninguna actividad. Solamente el estado “activo” puede conducir a un estado de “unión”, y la unión se produce únicamente cuando el agente encuentra su sensor específico, estando ambos en estado activo. Cuando el estado “unión” se establece, se activan los procesos vinculados a cada unión específica. Ejemplo: agente IL-2 y sensor IL-2R, se encuentran en estado activo, lo cual les permite unirse. Si se unen, se activa la vía de señalización correspondiente.

4.1.2.2. Monitores de datos

A continuación se explica el contenido de cada uno de los monitores mostrados en la interfaz gráfica del prototipo implementado, en los cuales se puede observar la evolución del proceso asociado al virus HPV16, y la respuesta del sistema inmune por parte del huésped. Si bien el modelo cuenta con un número de variables superior al mostrado en la interfaz, la limitación en la exposición de tal información se ve limitada por el espacio de visualización disponible, lo cual impide mostrar la totalidad de las variables del modelo construido.

Monitor principal prototipo HPV16-ALIFE

Cada una de las poblaciones celulares cuenta con una representación visual distinta, que le permite diferenciarse de otras poblaciones y observar su movilidad. La lista que sigue, corresponde a las poblaciones celulares incluidas en el código del prototipo y entre paréntesis se indica el nombre de la convención gráfica utilizada, la cual puede ser observada en la [figura 4.2](#). El prototipo incluye las siguientes poblaciones celulares: células-B (B cell), células-B de centro germinal (gcB cell), células plasma de corta vida (slPC), células-B de memoria de corta vida (slmBC), células plasma de larga vida (llPC), células-B de memoria de larga vida (llmBC), anticuerpos (antibody), células dendríticas plasmacitoides (pDC), células-T (T cell), células natural killer (NK), células-T CD4+ (T CD4), células-T CD8+ (T CD8), linfocitos-T citotóxicos (CTL), células-T CD8 de memoria (mTCD8), queratinocitos (KC), células dendríticas foliculares (FDC), células-T ayudadoras 1 (Th1), células-T ayudadoras 2 (Th2), células-T ayudadoras foliculares (Tfh), células-T ayudadoras 9 (Th9), células-T ayudadoras 17 (Th17), células-T ayudadoras 22 (Th22), células-T reguladoras (Treg), macrófagos (mfm1).

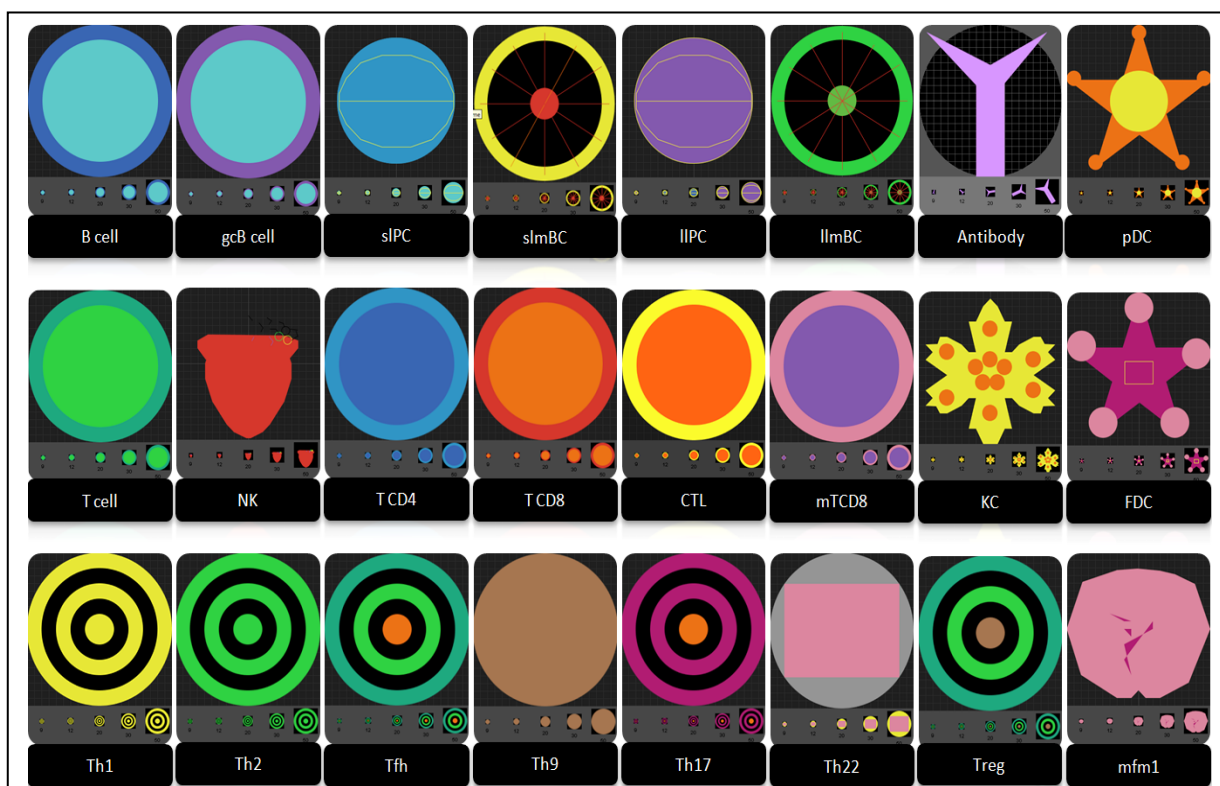
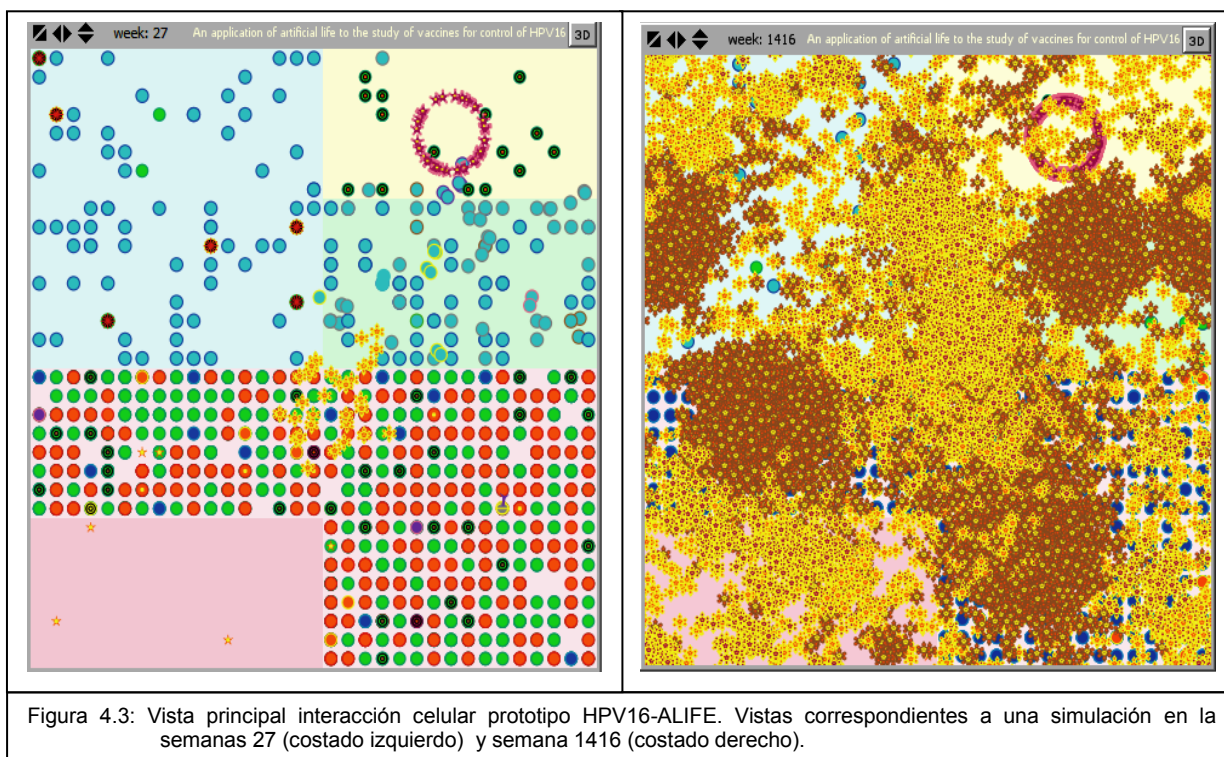


Figura 4.2: Convenciones visuales en representación de poblaciones celulares incluidas en el prototipo HPV16-ALIFE.



Desde el momento en que se crea la población celular progenitora inicial se activan los procesos que fueron descritos previamente, y su resultado se va observando en la vista que se muestra en la [figura 4.3](#), la cual va cambiando de acuerdo con las interacciones que emergen.

Monitores de estado grupos citoquinas

Reportan el estado de actividad, en cualquier punto del tiempo, de cada uno de los miembros que hacen parte de las familias de citoquinas TNFs, TGFs, IFNs, MIF, junto con sus correspondientes receptores (ver [figura 4.4](#), opción C).

Monitores de estado interleuquinas

Reportan el estado de actividad, en cualquier punto del tiempo, de cada una de las interleuquinas (ILs) definidas en el prototipo, con sus correspondientes receptores (ver [figura 4.4](#), opción D).

Monitores de estado factores de crecimiento

Reportan el estado de actividad, en cualquier punto del tiempo, de cada uno de los factores de crecimiento definidos en el prototipo (ver [figura 4.4](#), opción E).

Monitores de estado proteínas pro-apoptóticas

Reportan el estado de actividad, en cualquier punto del tiempo, de cada una de las proteínas pro-apoptóticas definidas en el prototipo (ver [figura 4.4](#), opción F).

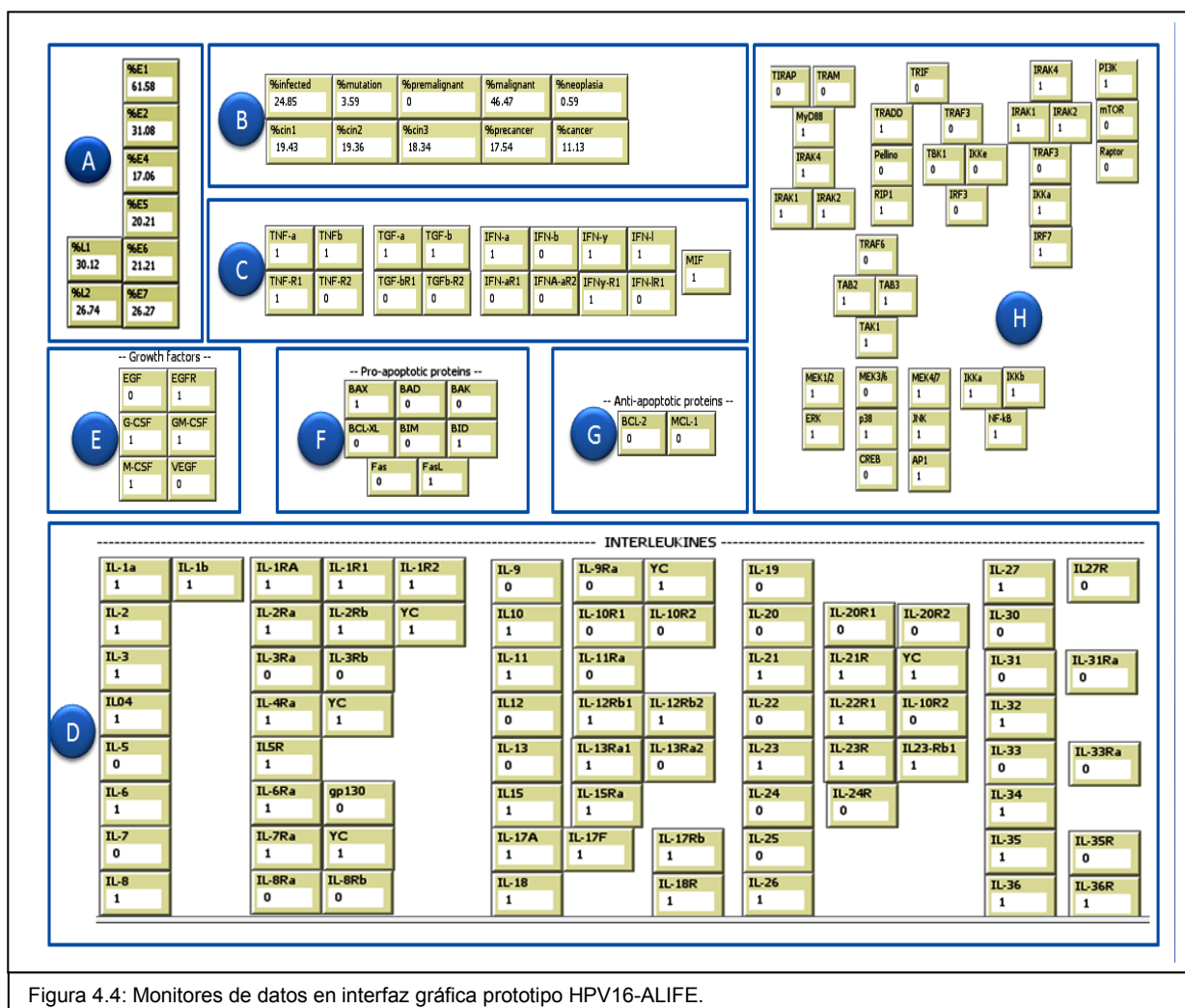


Figura 4.4: Monitores de datos en interfaz gráfica prototipo HPV16-ALIFE.

Monitores de estado proteínas anti-apoptóticas

Reportan el estado de actividad, en cualquier punto del tiempo, de cada una de las proteínas anti-apoptóticas definidas en el prototipo (ver [figura 4.4](#), opción G).

Monitores vías señalización TLRs

Reportan el estado de actividad, en cualquier punto del tiempo, de cada uno de los componentes de las vías de señalización TLRs definidas en el prototipo (ver [figura 4.4](#), opción H).

4.1.2.3. Gráficas de tendencia

El modelo cuenta con una vista principal en la que se refleja el resultado de las interacciones de los elementos que participan en los tres (3) niveles referidos, y algunas gráficas que permiten observar el comportamiento y tendencia de algunos de ellos. A continuación se explican cada una de estas gráficas.

Plotter-1 Poblaciones celulares-1

La gráfica muestra un comparativo de tendencia entre las poblaciones de células-B, células-T, células dendríticas, células-B en centro germinal, células dendríticas foliculares, células-T CD4+, células-T CD8+ y macrófagos, que se encuentran interactuando en la simulación en curso (ver [figura 4.5](#), opción “Cells populations-1”).

Plotter-2 Poblaciones celulares-2

La gráfica muestra un comparativo de tendencia entre las poblaciones de células plasma de corta vida, células-B de memoria de corta vida, células plasma de larga vida, células-B de memoria de larga vida, células NK, linfocitos-T citotóxicos, y células-T CD8 de memoria, que se encuentran interactuando en la simulación en curso (ver [figura 4.5](#), opción “Cells populations-2”).

Plotter-3 Poblaciones celulares-3

La gráfica muestra un comparativo de tendencia entre las poblaciones de células-T foliculares, células-T ayudadoras Th1, Th17, Th2, Th9, Th22, y células-T reguladoras, que se encuentran interactuando en la simulación en curso (ver [figura 4.5](#), opción “Cells populations-3”).

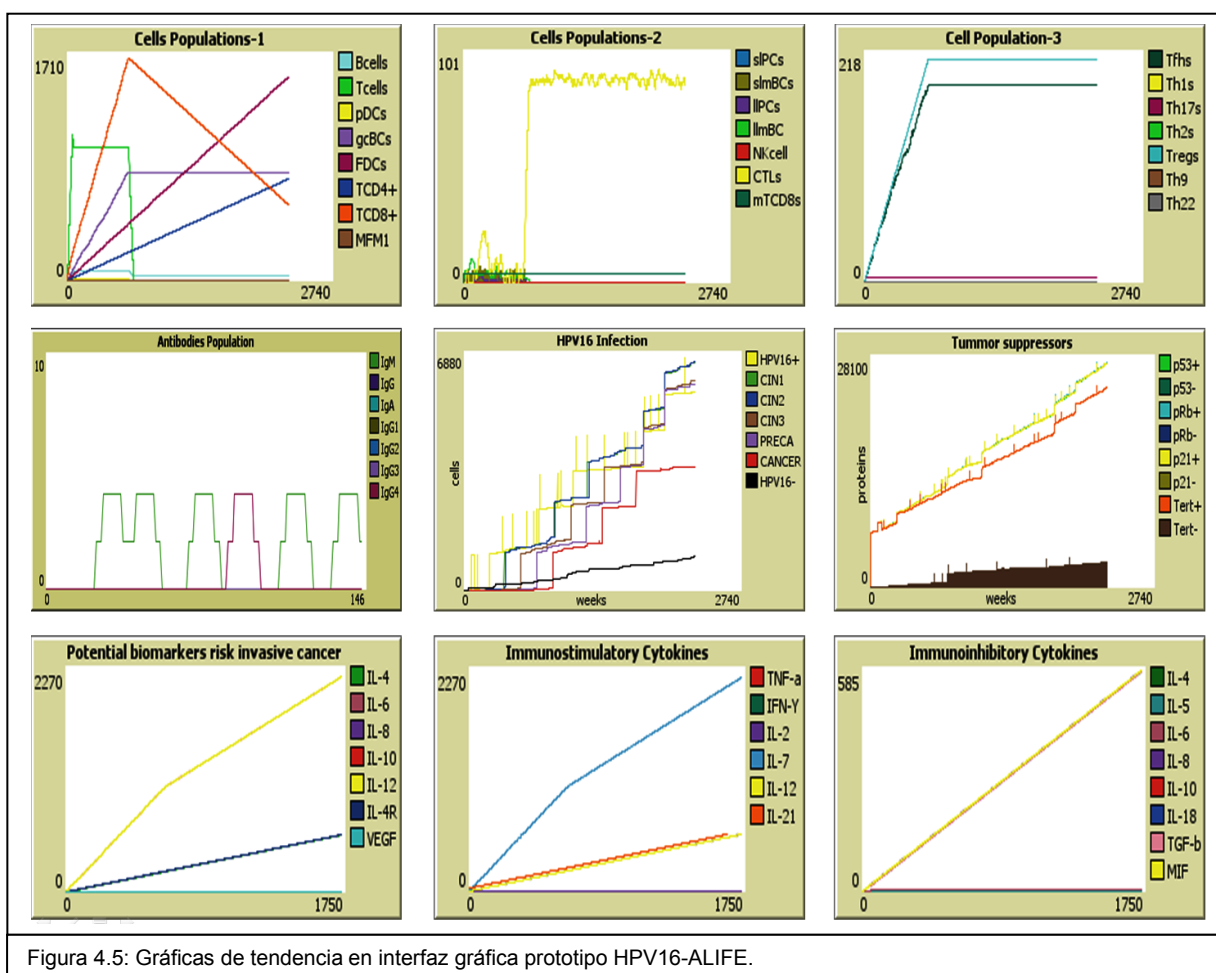


Figura 4.5: Gráficas de tendencia en interfaz gráfica prototipo HPV16-ALIFE.

Plotter-4 Poblaciones de anticuerpos

La gráfica muestra un comparativo de tendencia entre diferentes isotipos de anticuerpos expresados, entre los cuales se cuentan IgM, IgG, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 (ver [figura 4.5](#), opción “*Antibodies Population*”).

Plotter-5 Infección HPV16

La gráfica permite visualizar la tendencia en tiempo de evolución de células que no se encuentran infectadas por el virus (HPV16-), células que reportan estados infecciosos por HPV16 (HPV16+), células que reportan condiciones de progresión de la enfermedad, tales como CIN1, CIN2, CIN3; y células que muestran condiciones de riesgo de desarrollar cáncer cervical, tales como pre-cáncer y cáncer (ver [figura 4.5](#), opción “*HPV16 Infection*”).

Plotter-6 Supresores de tumores

La gráfica permite observar la tendencia de proteínas supresoras de tumores. Cuando están actuando en el modelo (*p53+*, *pRb+*, *p21+*, *Tert+*), se representan con líneas. De igual manera, cuando su actividad se ve degradada (*p53-*, *pRb-*, *p21-*, *Tert-*), por la intervención de variables y factores biológicos que hacen parte del ciclo de vida del HPV16, se representan por barras (ver [figura 4.5](#), opción “*Tummor suppressors*”).

Plotter-7 Potenciales biomarcadores para evaluar riesgo de cáncer invasivo

La gráfica muestra la tendencia de citoquinas y algunos receptores que han sido referenciadas como potenciales biomarcadores para evaluar el riesgo de cáncer invasivo y metástasis (ver libro anexo-2, capítulo IV, numerales 4.3.6, 4.3.7 y 4.3.8). La gráfica incluye el comportamiento de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-4R, y VEGF, no obstante se pueden incluir otras citoquinas y receptores de interés (ver [figura 4.5](#), opción “*Potential biomarkers risk invasive cancer*”).

Plotter-8 Citoquinas inmuno-estimuladoras

La gráfica muestra la tendencia de citoquinas que han sido involucradas en la biología del cáncer y clasificadas como citoquinas supresoras de tumores, que inducen inmunidad mediada por células y respuestas anti-tumorales, pero también su constante expresión puede promover procesos inflamatorios crónicos que pueden desencadenar en neoplasias. La gráfica incluye las citoquinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-12, e IL-21, no obstante se pueden incluir otras citoquinas y receptores de interés (ver [figura 4.5](#), opción “*Immunostimulatory Cytokines*”).

Plotter-9 Citoquinas inmuno-inhibidoras

La gráfica muestra la tendencia de citoquinas que han sido involucradas en la biología del cáncer y clasificadas como citoquinas inmuno-inhibidoras y que inducen inmunidad humoral. La gráfica incluye las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, TGF- β , MIF, no obstante se pueden incluir otras citoquinas y receptores de interés (ver [figura 4.5](#), opción “*Immunoinhibitory Cytokines*”).

4.1.3. Discusión sobre los parámetros del modelo de vida artificial

Los TLRs y las citoquinas juegan un importante rol como mediadores de la respuesta inmune innata y adaptativa. La literatura científica ha mostrado que participan en la defensa del organismo contra el cáncer. No obstante, una de las dificultades que se enfrenta en el entendimiento de sus mecanismos, es el doble rol que algunas reportan; de una parte, estimulando células inmunes para reconocer y eliminar células de cáncer; y de otra parte,

generando condiciones de inflamación prolongada que terminan en la formación de nichos pro-metastásicos, que permiten la formación de tumores gracias al escape del control inmune por parte del virus (en este caso HPV16) causante de la infección, frente a los mecanismos de defensa que activa el sistema inmune para su control. Otra dificultad, se enfrenta cuando se aborda el campo de la comparación de resultados de publicaciones científicas en aras de obtener un valor de referencia para el modelo, donde en algunos casos, se muestran resultados contrarios.

Con el ánimo de mitigar esta situación, algunos parámetros del modelo se basan en el promedio de valores de referencia aportados por los investigadores del tema específico, y en otros casos, el modelo opta por una de las opciones. Tal como se presenta con el tipo de división celular que genera el organismo (simétrica / asimétrica), número máximo de divisiones por población, condiciones que generan muerte celular, mecanismos precisos por los que el sistema inmune opta al tomar una vía y no otra, y situaciones en que se requiere el cumplimiento de la simultaneidad en la activación de vías para que determinado receptor responda. Estos aspectos han sido documentados en los libros anexo-1 y anexo-2, con base en la literatura revisada, y definidos en el resumen de los procesos implementados, reportados en el numeral 4.1.2.1 del presente capítulo.

Cuando la información es precisa y coincide con los resultados de varios autores, sin duda éste es el valor de referencia que el modelo considera (por ejemplo, la unión de ligandos y receptores específicos). Cuando no se conoce del todo el mecanismo preciso, se hace uso de la generación de opciones aleatorias con base en lo cual el modelo decide qué camino tomar (por ejemplo, en puntos concretos de vías de señalización que reportan varios caminos). Cuando se conoce que el componente existe pero aun no es claro su mecanismo biológico, éste no se implementa (ejemplo, IL-39). Cuando se reportan mecanismos idénticos pero resultados diferentes, el modelo trabaja con referentes promedios (ejemplo, niveles de expresión), y cuando existe ambigüedad en el mecanismo, como en el tipo de división que se presenta, el modelo utiliza ambos esquemas, no obstante un mecanismo aplicando a ciertas poblaciones celulares y el otro mecanismo a otras poblaciones diferentes de las primeras, según el proceso que se modela. Por ejemplo, se utiliza la división simétrica en procesos de proliferación celular, y división asimétrica en procesos de diferenciación de células progenitoras. Con relación al ciclo de vida del HPV16, se conservan las precisiones detalladas en (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013; Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010), donde se especifican los datos de referencia utilizados. A continuación se detallan los parámetros utilizados por el modelo de vida artificial propuesto.

4.1.3.1. Parámetros globales

Los parámetros globales del modelo de vida artificial propuesto, se definen a través de tres (3) componentes específicos que se encuentran en la herramienta de programación utilizada en su construcción, estos son: interruptores, deslizadores y selectores, los cuales se detallan a continuación.

Interruptores. Los interruptores permiten definir un estado inicial de actividad o inactividad de ciertos parámetros, los cuales son considerados cuando el proceso de simulación inicia, no obstante pueden variar como resultado de las interacciones que se generan entre los tres (3) niveles del modelo y en su relación con el ciclo de vida HPV16 (ver [figura 4.6](#), opción A).

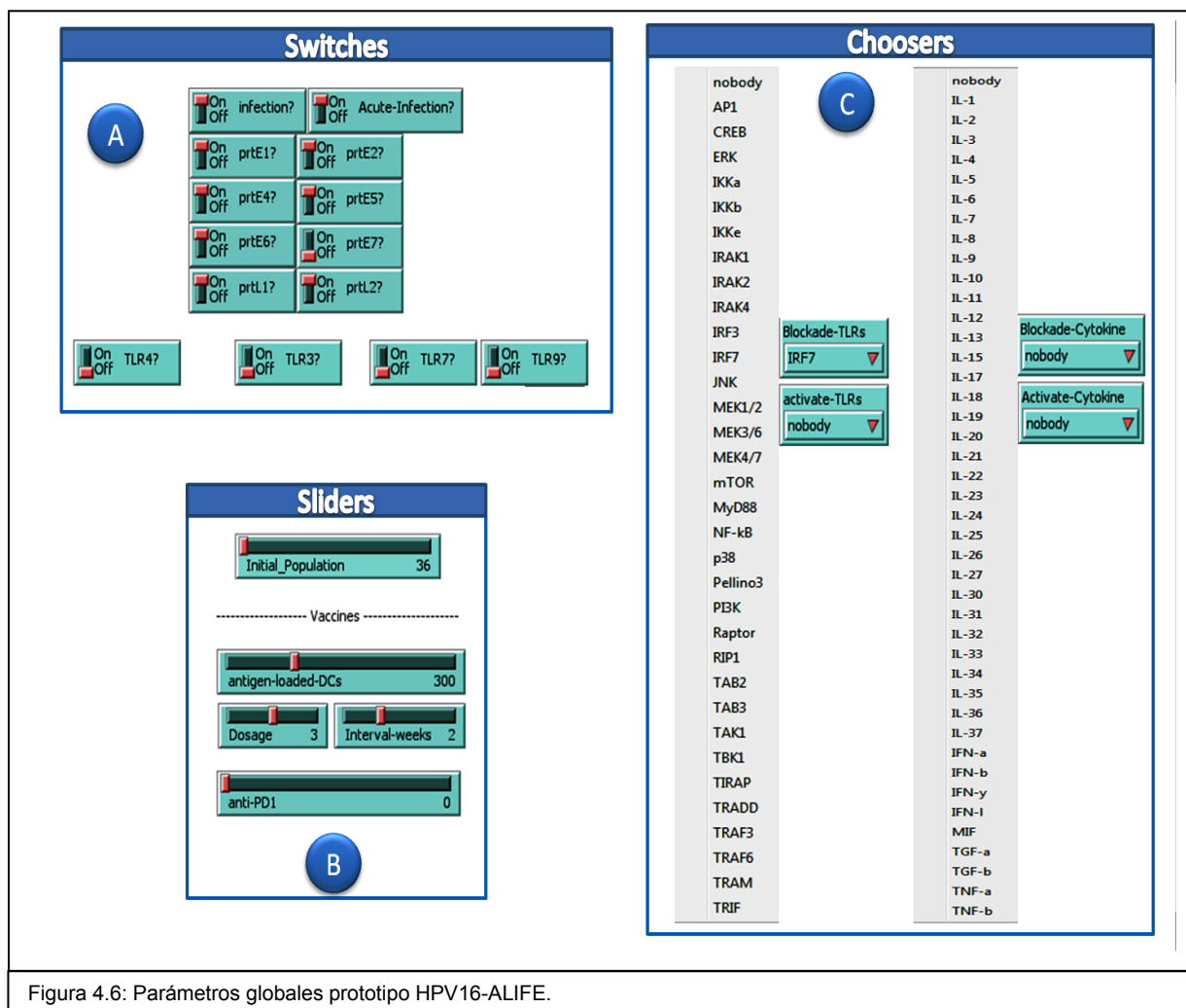


Figura 4.6: Parámetros globales prototipo HPV16-ALIFE.

- Estado de infección. Este parámetro se define a partir de dos (2) interruptores denominados “infection?” y “Acute-infection?”. El primero, controla si el modelo inicia la simulación partiendo de una infección previa natural (estado on), o si el modelo parte de una condición no infecciosa (estado off). El segundo, controla si el modelo inicia la simulación partiendo de una condición de infección aguda (estado on), o una condición de infección persistente (estado off).
- Proteínas virales. Conformado por ocho (8) interruptores que representan el estado inicial de las proteínas tempranas (E) y proteínas tardías (L), que intervienen en el ciclo de vida del virus HPV16. Estos son: *prtE1?*, *prtE2?*, *prtE4?*, *prtE5?*, *prtE6?*, *prtE7?*, *prtL1?*, *prtL2?*.
- Receptores TLRs. Conformado por cuatro (4) interruptores que representan el estado inicial de los receptores TLR3, TLR4, TLR7/TLR8 y TLR9, específicamente.

Deslizadores. Los deslizadores permiten establecer una cantidad que puede variar entre un rango inferior y un rango superior. En general, se asume como valor por defecto el rango inferior, en caso que el usuario no modifique el componente. El modelo lee estos valores y los utiliza durante el proceso de simulación, incluso si el usuario los modifica en tiempo de corrida (ver [figura 4.6](#), opción B).

- **Población inicial.** Este parámetro denominado “*Initial_Population*”, se define a través de un deslizador que permite establecer la cantidad de células a partir de las cuales el modelo generará poblaciones de células progenitoras iniciales, según lo establecido en el capítulo III, numeral 3.1.2.1.1, que luego conducirán a los procesos de diferenciación, proliferación y apoptosis celular, detallados en los procesos contenidos en el capítulo III, numeral 3.1.6.3.1 del presente documento.
- **Vacunas.** Los parámetros utilizados para el control de vacunas en el modelo, utiliza cuatro (4) deslizadores denominados “*antigen-loaded DCs*”, “*Dosage*”, “*Interval-weeks*”, “*anti-PD1*”, los cuales permiten establecer la carga inicial, dosis e intervalos de tiempo medido en semanas, para que cada dosis sea aplicada. La carga inicial puede variar entre DCs con antígenos E6/E7 o anti-PD1, según lo referido en el capítulo III, numeral 3.1.6.3.4 del presente documento. Los parámetros pueden ser definidos con antelación (condiciones pre-programadas) al inicio de la simulación, o ser definidos en tiempo de corrida. El modelo hará uso de los parámetros de vacunación pre-programados sólo cuando se detecte una condición de cáncer, toda vez que se trata de simular una vacuna terapéutica en un entorno de cáncer cervical. Bajo el escenario pre-programado, el sistema reportará la semana en la que efectivamente aplica una dosis y esta información puede ser revisada desplegando la vista asociada al centro de comandos (ver [figura 4.7](#)).

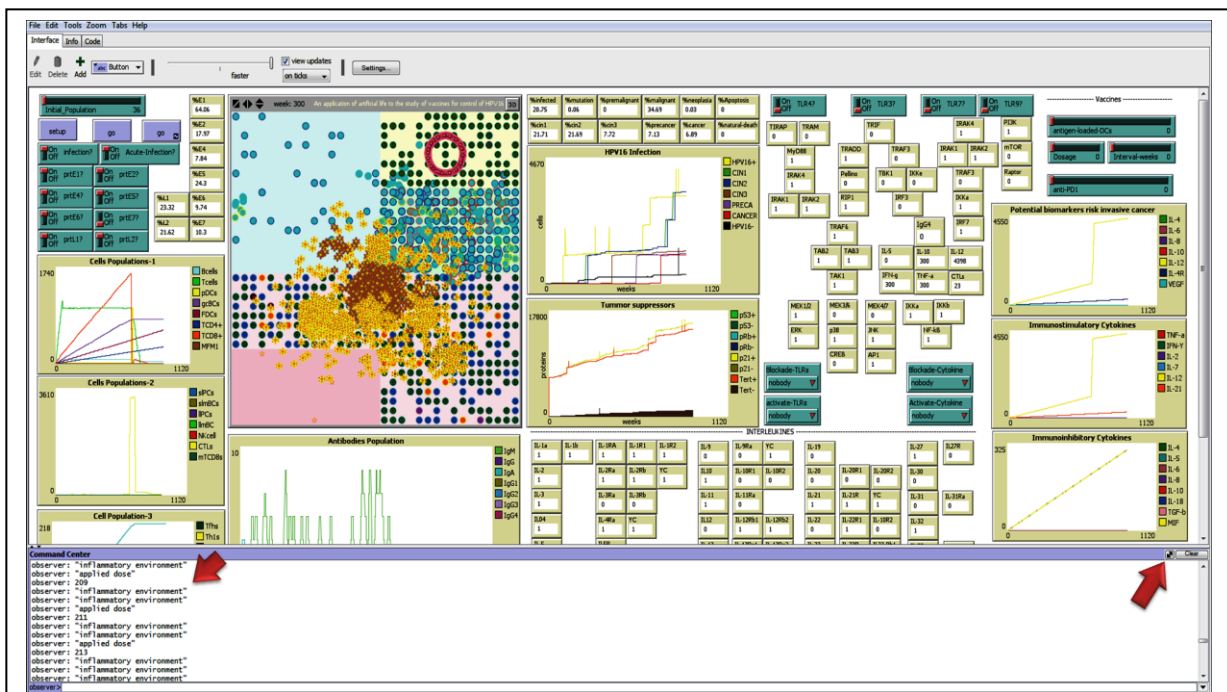


Figura 4.7: Confirmación aplicación dosis de vacuna pre-programada.

Selectores. Los selectores, permiten elegir un elemento de una lista desplegada, indicando al modelo que el elemento seleccionado será intervenido ya sea activándolo o inactivándolo. Al igual que los demás componentes, el modelo lee los valores definidos por el usuario, alterando la dinámica normal de la simulación a partir del cambio externo que se realiza sobre estos parámetros. El modelo permite bloquear o activar los elementos que a continuación se detallan, bien sea de forma previa, antes de iniciar la simulación, o en tiempo de corrida. Es importante aclarar, que solo se permite seleccionar un componente por cada selector, es decir, se pueden intervenir al menos cuatro (4) componentes en simultánea, bajo este concepto (ver [figura 4.6](#), opción C).

- **Bloqueadores / Activadores Citoquinas.** Permite bloquear o activar de forma externa, en tiempo de simulación, alguno de los siguientes componentes que hacen parte de las vías de señalización de las citoquinas. Sus componentes se presentan en orden alfabético para facilitar su ubicación: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, IL-37, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , MIF, TGF- α , TGF- β , TNF- α , TNF- β . La opción “*nobody*” indica que el selector no participa en la simulación. Al estar activos, los selectores Citoquinas simularán el comportamiento de un medicamento suministrado de forma permanente (1 vez cada semana), con un fin específico, bloquear o activar la vía de señalización de la citoquina seleccionada.
- **Bloqueadores / Activadores TLRs.** Permite bloquear o activar de forma externa, en tiempo de simulación, alguno de los siguientes componentes que hacen parte de las vías de señalización de los receptores Toll-like. Sus componentes se presenta en orden alfabético para facilitar su ubicación: AP1, CREB, ERK, IKK α , IKK β , IKK ϵ , IRAK1, IRAK2, IRAK4, IRF3, IRF7, JNK, MEK1/2, MEK3/6, MEK4/7, mTOR, MyD88, NF-kB, p38, Pellino3, PI3K, Raptor, RIP1, TAB2, TAB3, TAK1, TBK1, TIRAP, TRADD, TRAF3, TRAF6, TRAM, TRIF. La opción “*nobody*”, indica que el selector no participa en la simulación. Al estar activos, los selectores TLRs simularán el comportamiento de un medicamento con un fin específico, bloquear o activar el componente seleccionado que hace parte de una vía de señalización TLR, suministrado de forma permanente (1 vez cada semana).

4.1.3.2. Parámetros de control

Los parámetros de control permiten evidenciar el cambio de estado durante el proceso evolutivo del virus a través de su ciclo de vida, de las respuestas del sistema inmune ante la detección del patógeno y de la activación de sus mecanismos de defensa, a través de las interacciones entre las diferentes poblaciones celulares afectadas por la expresión de Citoquinas y TLRs.

A nivel del microambiente celular. Se definen parámetros que corresponden a las moléculas diferenciadoras de la población específica y algunas moléculas de superficie, claves en los procesos de interacción frente a otras poblaciones. Las moléculas en general, podrán reportar un estado de actividad, inactividad o unión, según los procesos evolutivos que medien en la simulación.

- Población células-B (Bcells). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-B (BCR), complejo de histocompatibilidad mayor tipo II (MHC-II), y las moléculas CD287 y CD289.
 - Población células-B en centro germinal (gcBCs). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-B (BCR), CXCR4, MHC-II, CD40, CD80, CD86, ICOSL, IGBC, CXCR5.
 - Población células-T (Tcells). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), y CD28.
 - Población células-T CD4+ (TCD4s). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), CD4 y CD28.
 - Población células-T CD8+ (TCD8s). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), CD8 y CD28.
 - Población células-T CD8 de memoria (MTCD8s). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), CD8, y CD122.
 - Población linfocitos-T citotóxicos (CTLs). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), Eomes, y T-bet.
 - Población células-T ayudadoras foliculares (TFHs). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), BCL6, STAT3, CD28, CD40L, ICOS, CXCL13.
 - Población células-T ayudadoras 17 (TH17s). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), ROR γ t, STAT3, ICOS.
 - Población células-T ayudadoras 1 (TH1s). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), T-bet, STAT1, STAT4, ICOS.
 - Población células-T ayudadoras 2 (TH2s). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), GATA3, STAT6, ICOS.
 - Población células-T reguladoras (TREGs). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), Foxp3, STAT5, CTLA4, OX40, 4-1BB.
 - Población células-T ayudadoras 9 (TH9s). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR), e IRF4.
 - Población células-T ayudadoras 22 (TH22s). Controla los miembros de la población que expresan el receptor de células-T (TCR). Si bien el regulado maestro de esta población no ha sido identificado, esta población controla los miembros que resultan del proceso de diferenciación a partir de la expresión de IL-6 y TNF- α .
 - Población células dendríticas (DCs). Controla los miembros de la población que expresan MHC-I, MHC-II, CD80, CD86, CD283, CD284.
 - Población células dendríticas foliculares (FDCs). Controla los miembros de la población de células dendríticas en centro germinal.
 - Población macrófagos (MFM1s). Controla los miembros de la población que expresan IRF5, STAT1, MHC-II, CD80, CD86.
 - Población células Natural Killer (NKs). Controla los miembros de la población que expresan T-bet, Eomes, NKG2, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46.
 - Población células plasma de corta vida (slPCs). Controla los miembros de corta vida de la población que expresan BLIMP1, CD288, CD289.
 - Población células-B de memoria de corta vida (slmBCs). Controla los miembros de corta vida de la población que expresan CD287, CD289.
 - Población células plasma de larga vida (llPCs). Controla los miembros de larga vida de la población que expresan BLIMP1, CD287, CD289.
 - Población células-B de memoria de larga vida (llmBCs). Controla los miembros de larga vida de la población que expresan CD287, CD289.
-

- Población anticuerpos (Antibodies). Controla los miembros de la población que expresan diferentes isotipos de anticuerpos.
- Población queratinocitos (KCs). Controla los miembros de la población que expresan MHC-I, CD283, CD287, CD289.

A nivel del ciclo de vida del HPV16. Se definen parámetros que permite evidenciar el cambio de estado en el proceso evolutivo del virus a través de su ciclo de vida. Incluye los parámetros de transiciones (represora?, prolifera?, degradap53?, degradapRb?, degradap21?, degradaTert, replicación?, transcripción?, liberavirus?, ensamblaviral?, encapsidación?, crecimiento?, mutación?, apoptosis?, muertenatural?, premaligno?, maligno? Infeccion?), parámetros de estado (neoplasia?, hpv16+?, hpv16-¿, cin1?, cin2?, cin3?, preca?, cancr?), parámetros de regresión (regresion1?, regresion2?, regresion3?, regresion4?) y parámetros de control (tiempo-vida, tiempo infección), todos ellos previamente definidos y explicados en (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013; Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010).

A nivel del microambiente TLR. Se definen parámetros que corresponden a los ligandos que mediante su unión al receptor TLR, permite activar su vía de señalización conformada por los componentes que a continuación se relacionan. Los ligandos podrán reportar estados de actividad, inactividad o unión. Los componentes en general, a este nivel, reportan un estado de actividad o inactividad, según las condiciones del entorno.

- Ligandos. Controla la actividad de Poly (I:C), LPS, CpG para activar la señal de TLR3, TLR4, y TLR7/TLR8/TLR9, respectivamente.
- Componentes vía de señalización. Controla la actividad de los componentes que hacen parte de las vías de señalización TLR, mediados por las interacciones del entorno. Entre los parámetros se incluyen algunas quinasas, factores de respuesta, factores asociados a receptores, y proteínas, entre otros, a saber: TRADD, TRAF2, TRAF3, TRAF6, IRAK1, IRAK2, IRAK4, IRAKM, RIP1, TBK1, TAK1, TAB1, TAB2, TAB3, MEK12, MEK36, MEK47, IKK α , IKK β , IKK ϵ , I κ B, ERK, p38, JNK, PI3K, Akt, CREB, AP1, IRF1, IRF3, IRF7, IRF9, NF-K κ B. Además de algunos reguladores negativos, tales como: A20, Pellino3, TANK.

A nivel del microambiente Citoquinas. Se definen parámetros que conforman componentes que participan de las vías de señalización de citoquinas incorporadas al modelo de vida artificial, los cuales corresponden a receptores de citoquinas, ciertas moléculas de adhesión, enzimas, proteínas, supresores de tumores, metaloproteinasas, entre otros. El modelo de vida artificial, a nivel de citoquinas incluye los parámetros que a continuación se relacionan, cuyos detalles biológicos son referenciados en los libros anexo-1 y anexo-2.

- Receptores de citoquinas: IL1R1, IL1RA, IL1R2, IL2Ra, IL2Rb, IL3Ra, IL3Rb, IL4Ra, IL5R, IL6Ra, IL7Ra, IL8Ra, IL8Rb, IL9Ra, IL10R1, IL10R2, IL11Ra, IL12R, IL12Rb1, IL12Rb2, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15R, IL17Rb, IL18R, IL20R1, IL20R2, IL21R, IL22R1, IL23R, IL24R, IL27R, IL31Ra, IL33Ra, IL35R, IL36R, CD132 (cadena γ c), OSMR, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IFNIR1, TNFR1, TNFR2, TGFbR1, TGFbR2, CXCR1, CXCR2.
- Moléculas: VCAM1, Eselectin, ICAM1, LFA1, NIK.
- Factores de crecimiento: GM-CSF, G-CSF, VEGF, EGFR, EGF, M-CSF,
- Enzimas: iNOS, UCHL1, PP2A.

- Proteínas: Perforin, Granzyme, gp130, COX2, PGE2, mTOR, Raptor, PD1, PDL1, PDL2, cIAP1, cIAP2, FADD, IFRD1, ATF2, cJun, cFos, AIM2, IFI16, SOCS, SOCS3, p53, p21, pRb, Tert.
 - Metaloproteinasas: MMP1, MMP2, MMP9,
 - Quinasas: JAK1, JAK2, JAK3, TYK2.
 - Apoptosis: Fas, FasL, caspase8, caspase37, caspase9, tBid, CytoC, AIF, Apaf1, Smac, cFLIP, BAX, BAK, BAD, BID, BIM, BCL2, BCLXL, MCL1.
 - Transcriptores de señal: SMAD2, SMAD3, SMAD4.
 - Transductores de señal: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6.
-

V EXPERIMENTACION Y RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS

El modelo de vida artificial HPV16-ALIFE permite probar diferentes estrategias a partir de la combinación de variables. Con el fin de verificar el comportamiento del modelo de vida artificial y determinar si la naturaleza finita de la simulación afecta los resultados, se realizan solamente algunos experimentos como ejemplo, variando ciertos parámetros de acuerdo con las reglas de experimentación. Si bien se proponen solo algunos experimentos, el modelo permite múltiples opciones con varias combinaciones, y básicamente por el alcance y tiempo para realizar el presente trabajo, se realizan los experimentos que a continuación se describen.

5.1.1. Experimentación

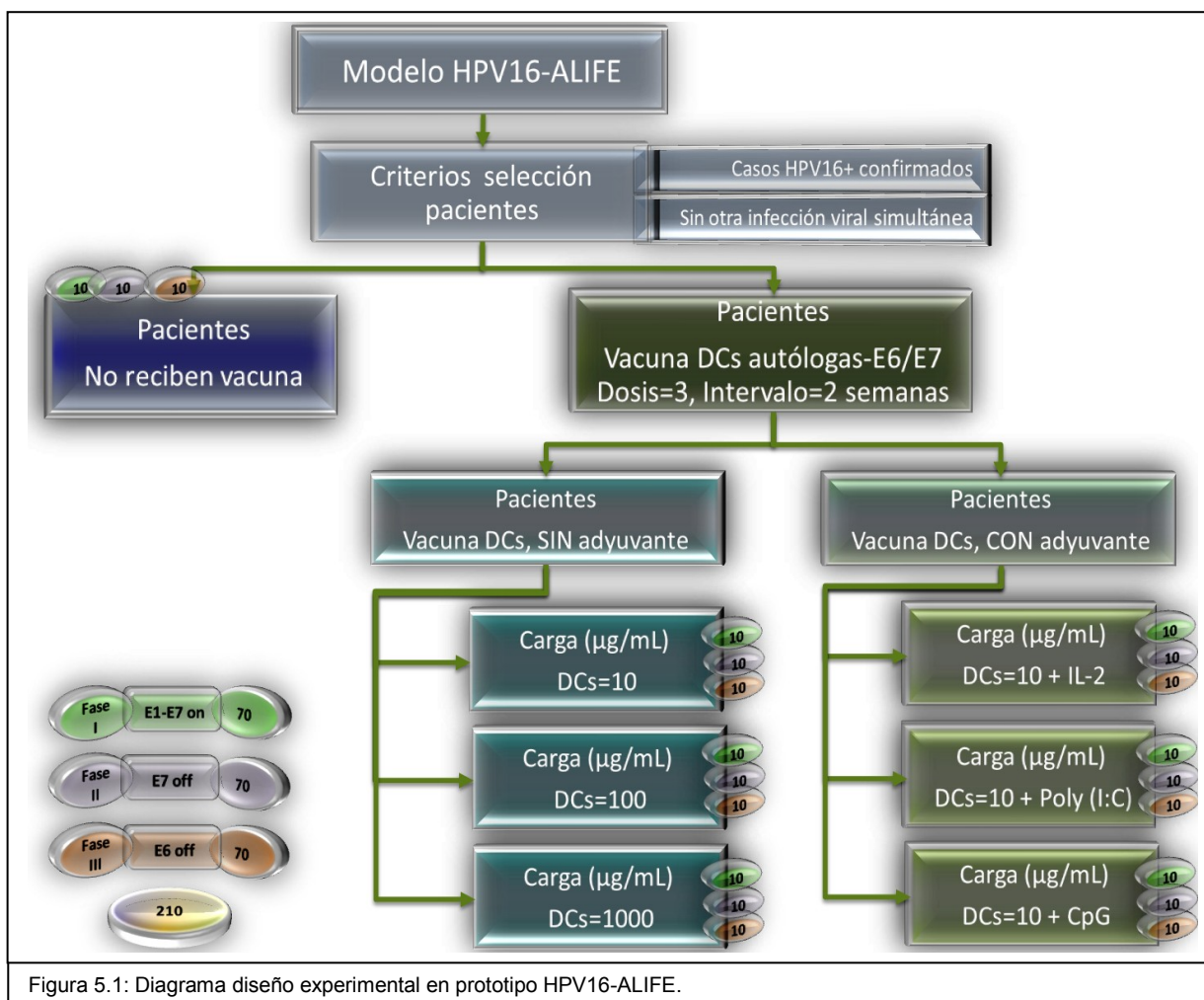
La experimentación realizada con el modelo de vida artificial se basa en las siguientes condiciones.

(a) Paciente simulado, corresponde al conjunto de componentes virtuales que representan el sistema inmune, los efectos que resultan de su interacción con el ciclo de vida del HPV16, y el estímulo desencadenado por una vacuna en particular, los cuales son simulados por el modelo HPV16-ALIFE. Por lo tanto, los datos que se observan en los diferentes monitores y gráficas de tendencia sobre una corrida específica del modelo, se refieren a un mismo paciente que evoluciona de forma continua durante 1,400 semanas. Solo cuando el modelo se detiene e inicia una nueva simulación por este mismo periodo de tiempo, se estará refiriendo a otro paciente simulado, diferente del anterior. Dentro del contexto de la experimentación que se realiza con este modelo, el término “paciente” tendrá específicamente esta connotación.

(b) Vacuna terapéutica simulada, corresponde a una cantidad determinada de células dendríticas autólogas virtuales, cargadas de antígeno E6/E7, que es aplicada al paciente simulado, en el momento y número de dosis que determine el modelo de acuerdo con las condiciones del microambiente, considerando la frecuencia y límite máximo de dosis que se fije previamente en cada tipo de experimento. La vacuna terapéutica simulada, no considera niveles de toxicidad, vía de administración, ni eventos adversos generados a partir de su aplicación. Dentro del contexto de la experimentación que se realiza con este modelo, el término “vacuna” tendrá específicamente esta connotación.

(c) Se asume que los pacientes que participan en cada experimento, son casos confirmados HPV16+, que no reportan ninguna otra infección viral en simultánea.

(d) La [figura 5.1](#), muestra el diagrama del diseño experimental, en el cual se propone un grupo de pacientes que no recibe vacuna, un grupo de pacientes que recibe vacuna sin adyuvante, y un grupo de pacientes que recibe vacuna con adyuvante.



Los experimentos se realizan en tres (3) fases (I, II, III). Cada fase agrupa siete (7) ciclos que corresponden a siete (7) diferentes tipos de experimentos. Cada experimento se corre en un grupo de diez (10) diferentes pacientes, y cada corrida representa un solo paciente. Es decir, cada fase representa un total de setenta (70) pacientes, y al final de las tres (3) fases se tiene un equivalente de doscientos diez (210) pacientes. Cada tipo de experimento se repite diez (10) veces con diferente paciente. Por cada paciente y experimento, se toman registros en siete (7) diferentes semanas, midiendo un total de veintiuna (21) variables y captando la imagen de la evolución en el último punto de control. Al iniciar cada experimento, en fase I, los interruptores de proteínas se encuentran todos en estado activo; en fase II, se apaga el interruptor de la proteína E7; y en fase III se apaga el interruptor de la proteína E6.

(e) Los experimentos del ejercicio que se describe, consideran las variantes que resultan de combinar la expresión activa e inactiva de los deslizadores de vacunas, y selectores de medicamentos con un objetivo específico, fijando siete (7) puntos de control y registro, particularmente durante las semanas cuarenta y ocho (48), cincuenta y tres (53), ciento cincuenta y seis (156), doscientos ocho (208), trescientos (300), quinientos (500) y mil cuatrocientos (1400).

(f) El modelo considera rangos amplios en los que se encuentran incluidas conclusiones presentadas por diferentes estudios revisados, referidos previamente en (Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2013; Escobar-Ospina, M.E. & Gómez-Perdomo, J., 2010). Con base en ello, los siete (7) puntos de control se eligen, bajo los criterios que se indican a continuación.

- (f1) Semana cuarenta y ocho (48): El tiempo medio para la detección de anticuerpos a partir de la detección primaria de DNA HPV16, se ha reportado en 10.5 meses en secreciones cervicales y 19.1 meses en suero. La pérdida de anticuerpos, se ha reportado en 12 meses en secreciones cervicales y 13.6 en suero.
- (f2) Semana cincuenta y tres (53): entre uno (1) y dos (2) años de exposición, las infecciones por HPV son despejadas o suprimidas a niveles indetectables por la inmunidad mediada por células.
- (f3) Semana ciento cincuenta y seis (156): varios trabajos han mostrado que la duración media de la infección por HPV entre mujeres que de base eran HPV negativo, varía entre 8.5 y 19.4 meses. Se adiciona este control, dado que las semanas cuarenta y ocho (48) y cincuenta y tres (53) se encuentran dentro del rango controlado previamente.
- (f4) Semana doscientos ocho (208): infección a largo plazo reporta un promedio de 5.1 años.
- (f5) Semana trescientos (300): varios estudios han mostrado que mujeres con alto riesgo de desarrollar HPV, presentan una citología anormal a los dos (2) años, o CIN3 a los cuatro (4) años.
- (f6) Semanas quinientos (500) y mil cuatrocientos (1400): se reportan valores en estas semanas, considerando que cáncer cervical puede desarrollarse diez (10) años después de la exposición ante el virus (primer caso), y se desea observar reincidencia del cáncer en los años posteriores (segundo caso), luego de la intervención de una vacuna terapéutica.

(g) Los siete (7) tipos de experimentos planteados corresponden a los escenarios que a continuación se describen. En el modelo de vida artificial, cada experimento propuesto evoluciona durante mil cuatrocientas (1,400) semanas sobre un mismo paciente, partiendo de una condición inicial de infección natural causada por HPV16+.

- (g1) Experimento tipo-1 (Exp-1): Los pacientes que pertenecen a este grupo presentan infección por HPV16 y no reciben ningún tipo de vacuna terapéutica.
 - (g2) Experimento tipo-2 (Exp-2): Los pacientes reciben células dendríticas autólogas cargadas de antígenos E6/E7, equivalentes a diez (10) µg/mL, en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre dosis.
-

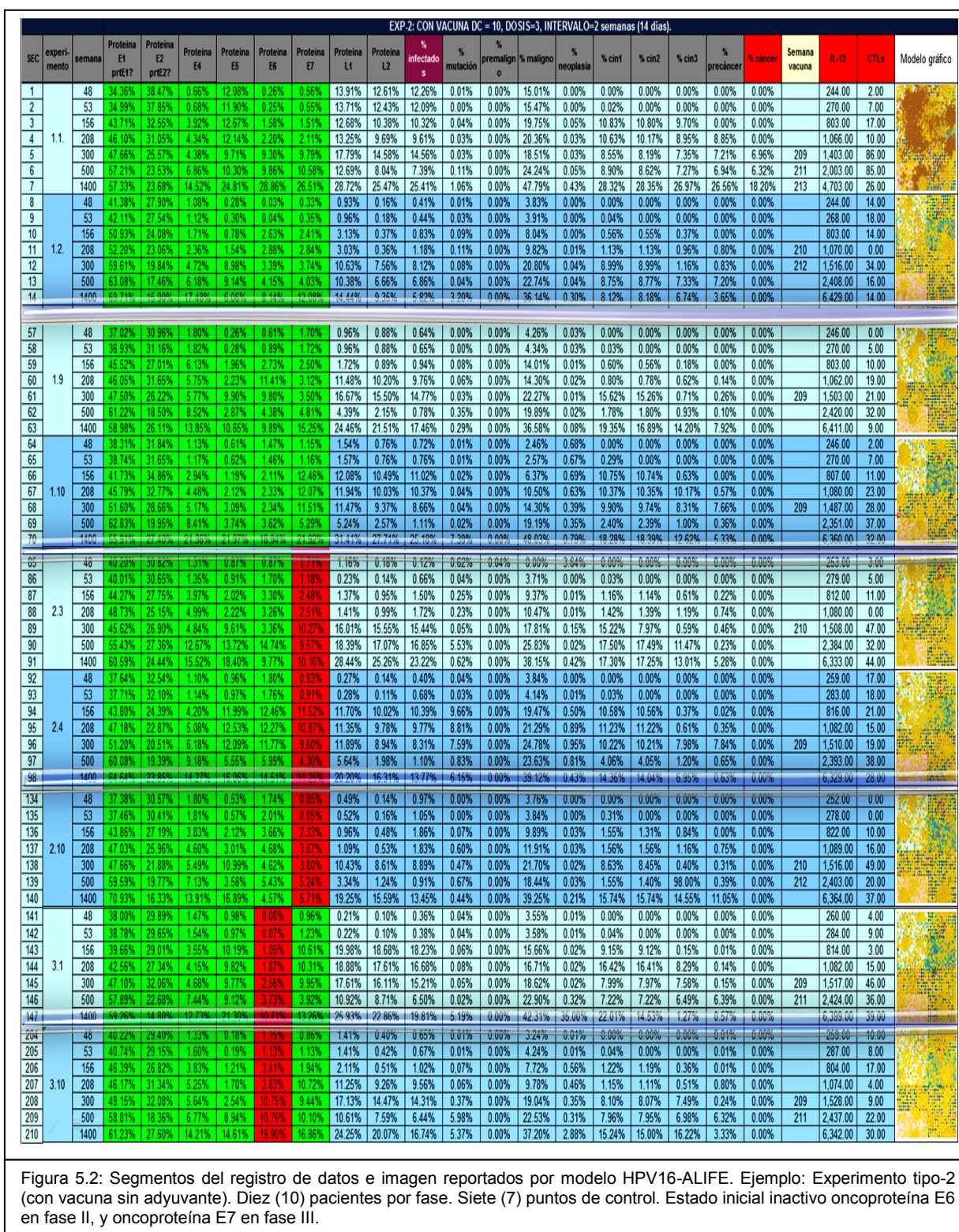
- (g3) Experimento tipo-3 (Exp-3): Los pacientes reciben células dendríticas autólogas cargadas de antígenos E6/E7, equivalentes a cien (100) $\mu\text{g/mL}$, en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre dosis.
- (g4) Experimento tipo-4 (Exp-4): Los pacientes reciben células dendríticas autólogas cargadas de antígenos E6/E7, equivalentes a mil (1,000) $\mu\text{g/mL}$, en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre dosis.
- (g5) Experimento tipo-5 (Exp-5): Los pacientes reciben células dendríticas autólogas cargadas de antígenos E6/E7, equivalentes a diez (10) $\mu\text{g/mL}$, adicionando citoquina IL-2, en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre dosis.
- (g6) Experimento tipo-6 (Exp-6): Los pacientes reciben células dendríticas autólogas cargadas de antígenos E6/E7, equivalentes a diez (10) $\mu\text{g/mL}$, adicionando Poly (I:C) (activando TLR3), en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre dosis.
- (g7) Experimento tipo-7 (Exp-7): Los pacientes reciben células dendríticas autólogas cargadas de antígenos E6/E7, equivalentes a diez (10) $\mu\text{g/mL}$, adicionando CpG (activando TLR9), en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre dosis.

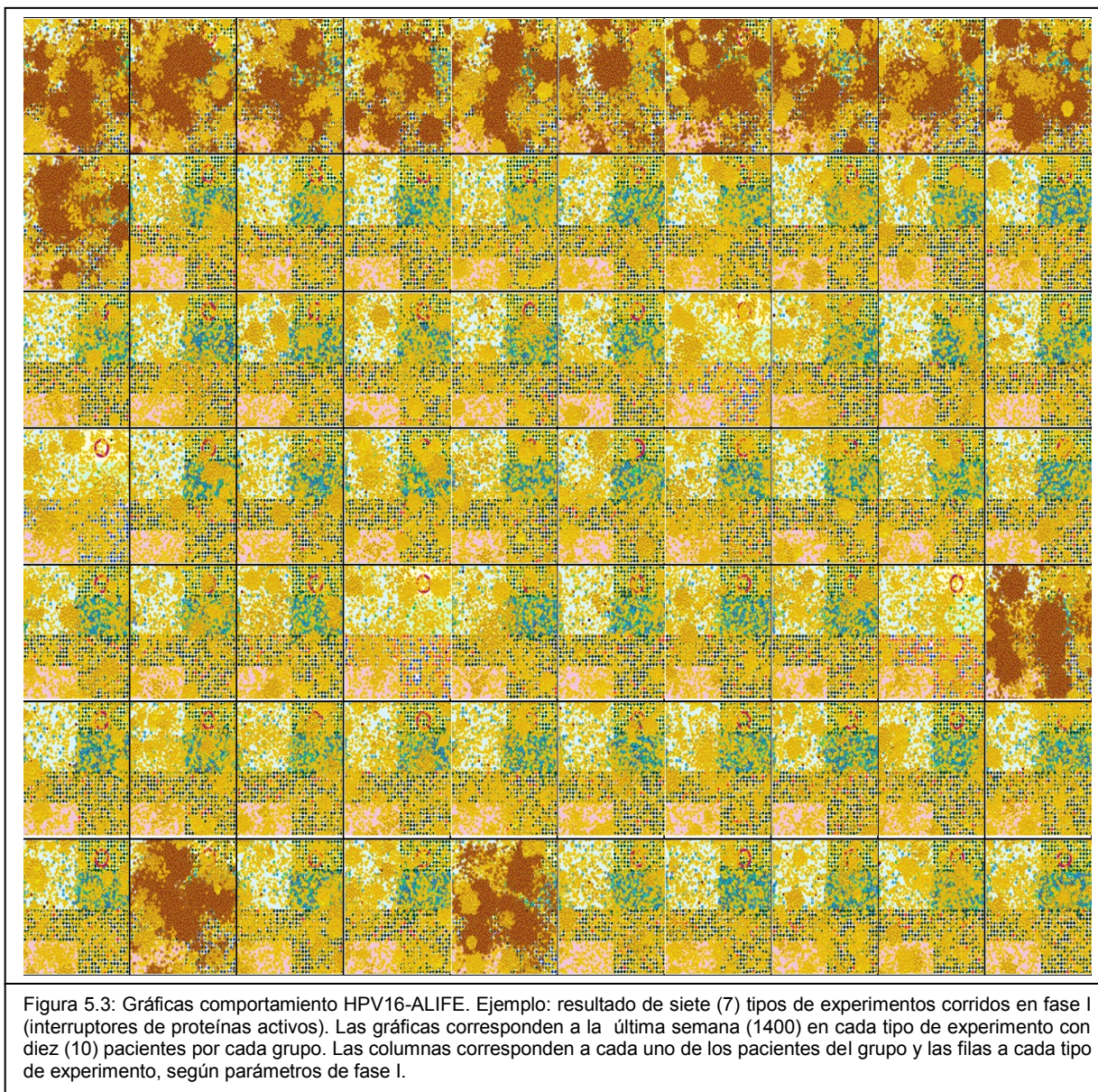
Los escenarios que se proponen buscan probar el modelo de vida artificial principalmente en tres (3) escenarios: (a) sin vacuna (Exp-1), (b) vacuna sin adyuvante (Exp-2, Exp-3 y Exp-4), y (c) vacuna con adyuvante (Exp-5, Exp-6 y Exp-7). Adicionalmente, en cada tipo de experimento se incluyen algunas variaciones de estado, basadas en la expresión inicial de las oncoproteínas virales E6 y E7 (fases II y III, respectivamente).

(h) Por cada experimento y punto de control (semanas 48, 53, 156, 208, 300, 500 y 1400), se registran los valores reportados por los diferentes monitores, tal como se observa en el ejemplo de la [figura 5.2](#). Para los experimentos que incluyen vacunas, aunque se planifican tres (3) dosis, el modelo confirma las dosis que realmente requirió y también confirma la semana específica en que aplicó la dosis (en la figura, columna semana vacuna), respetando el intervalo entre dosis previamente programado en el deslizador correspondiente. Además, se congela una gráfica de comportamiento por cada paciente, con el fin de visualizar la variación generada por los parámetros definidos en cada uno de los experimentos, tal como se observa en la [figura 5.3](#).

(i) Posteriormente se obtienen los valores promedios a partir de los diez (10) pacientes simulados en cada grupo, luego se obtienen los promedios de los ciclos que conforman cada fase, y finalmente se calculan los percentiles de las mediciones realizadas por cada tipo de experimento (ver tablas [5.1.1 – 5.1.7](#)), a partir de los cuales se generan las gráficas de comportamiento de las variables que se desean seguir (ver [figura 5.4 – 5.6](#)), con el fin de realizar el análisis correspondiente.

Es importante aclarar, que el modelo permite seguir otros comportamientos adicionales a los propuestos en este ejemplo, tal como el mostrado por las demás poblaciones celulares, otras cuarenta y ocho (48) citoquinas, y algunas moléculas de superficie, pero será el usuario quien determine las variables a seguir por su interés particular.





5.1.2. Resultados

Cada uno de los experimentos realizados a partir de poblaciones de pacientes infectados por HPV16+, se sintetiza en las tablas de percentiles y en gráficas de comportamiento, que permiten observar los niveles de las lesiones intraepiteliales cervicales (estados CIN1, CIN2, CIN3), condiciones de pre-cáncer y cáncer, además de los niveles de expresión que reportan las proteínas virales (E1-E6, L1-L2), frente a la intervención o ausencia de las vacunas terapéuticas propuestas en los experimentos realizados. Adicionalmente, se sigue el comportamiento de la interleuquina-12 (IL-12) y el nivel de proliferación de la población de linfocitos T citotóxicos (CTLs).

La [tabla 5.1.1](#), muestra los percentiles correspondientes a los experimentos realizados a pacientes con infección por HPV16, que no reciben ningún tipo de vacuna terapéutica. Se reportan los niveles de expresión de proteínas virales (bloque proteínas), principales indicadores de progresión de la enfermedad (bloque transiciones), y niveles de indicadores claves seleccionados para este ejercicio (IND), que resulta de la evolución generada durante 1,400 semanas simuladas.

Tabla 5.1.1: Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE. Experimentos realizados SIN VACUNA						
HPV16-ALIFE		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
P r o t e i n a s	E1	38.03%	42.23%	47.90%	53.57%	56.95%
	E2	23.97%	25.51%	28.07%	30.02%	31.36%
	E4	1.19%	3.55%	4.17%	7.41%	17.70%
	E5	2.10%	3.49%	6.39%	9.99%	23.79%
	E6	2.18%	3.27%	5.05%	10.57%	31.52%
	E7	1.47%	2.62%	5.04%	10.89%	31.58%
	L1	3.40%	6.76%	10.93%	14.18%	34.19%
T r a n s i c i o n e s	L2	3.03%	5.89%	9.30%	12.52%	30.21%
	% infectados	3.62%	6.72%	9.45%	12.60%	30.66%
	% mutación	0.39%	0.46%	0.95%	1.44%	6.11%
	% premaligno	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	% maligno	4.86%	8.95%	16.34%	22.97%	47.00%
	% neoplasia	0.01%	0.07%	0.15%	0.16%	0.85%
	% cin1	0.00%	2.95%	8.82%	11.71%	30.76%
	% cin2	0.00%	2.62%	8.76%	11.53%	30.13%
	% cin3	0.00%	1.41%	5.15%	9.66%	28.10%
I n d	% precáncer	0.00%	0.00%	2.59%	7.17%	25.65%
	% cáncer	0.00%	0.00%	0.00%	4.74%	18.86%
T	IL-12	240.43	523.55	1007.26	1625.47	4625.43
	CTLs	7.53	9.70	10.23	53.95	88.23
Dosis vacunas semanas		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Bajo la misma estructura, las [tabla 5.1.2](#), [tabla 5.1.3](#) y [tabla 5.1.4](#), reportan los percentiles correspondientes a los experimentos realizados con vacunas sin adyuvante. Las [tabla 5.1.5](#), [tabla 5.1.6](#) y [tabla 5.1.7](#), reportan los percentiles correspondiente a los experimentos realizados con vacunas y con adyuvantes IL-2, Poly (I:C) y CpG, respectivamente. Adicional a las variables seguidas antes mencionadas, se suma el reporte de dosis aplicadas en cada tipo de experimento. En los todos los casos, el modelo evoluciona hasta la semana 1,400.

La [tabla 5.1.2](#), muestra los percentiles correspondientes a los experimentos realizados a pacientes con infección por HPV16+, que reciben entre una (1) y tres (3) dosis de vacuna, según lo especificado en el experimento tipo-2 (DC=10).

La [tabla 5.1.3](#), muestra los percentiles correspondientes a los experimentos realizados a pacientes con infección por HPV16+, que reciben entre una (1) y tres (3) dosis de vacuna, según lo especificado en el experimento tipo-3 (DC=100).

La [tabla 5.1.4](#), muestra los percentiles correspondientes a los experimentos realizados a pacientes con infección por HPV16+, que reciben entre una (1) y tres (3) dosis de vacuna, según lo especificado en el experimento tipo-4 (DC=1000).

Tabla 5.1.2: Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE. EXP.2: VACUNA DC=10, DOSIS=3, INTERVALO=2 semanas							Tabla 5.1.3: Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE EXP.3: VACUNA DC=100, DOSIS=3, INTERVALO=2 semanas						
HPV16-ALIFE		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo	HPV16-ALIFE		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
P r o t e i n a s	E1	39.30%	42.82%	48.52%	55.48%	63.43%	P r o t e i n a s	E1	39.04%	43.32%	48.38%	56.23%	64.52%
	E2	21.97%	23.69%	26.41%	28.88%	30.43%		E2	21.58%	22.58%	25.67%	28.92%	30.44%
	E4	1.48%	3.03%	5.23%	7.46%	16.79%		E4	1.36%	2.99%	5.02%	7.64%	19.64%
	E5	1.18%	2.72%	4.74%	7.33%	14.47%		E5	1.03%	2.26%	4.72%	7.70%	12.28%
	E6	1.06%	2.37%	4.44%	7.62%	13.10%		E6	1.40%	2.95%	4.84%	5.82%	12.92%
	E7	0.93%	2.82%	6.38%	7.07%	13.30%		E7	1.47%	2.40%	4.15%	5.59%	12.32%
	L1	1.47%	3.71%	8.05%	11.49%	24.03%		L1	2.59%	4.97%	8.45%	10.81%	21.83%
T r a n s i c i o n e s	L2	1.16%	3.21%	6.66%	9.44%	20.27%	T r a n s i c i o n e s	L2	2.20%	4.43%	7.15%	8.80%	18.12%
	% infectados	1.33%	3.25%	7.00%	8.69%	17.46%		% infectados	2.56%	4.59%	7.48%	7.87%	44.28%
	% mutación	0.06%	0.28%	0.78%	1.08%	3.74%		% mutación	0.43%	0.52%	0.62%	0.72%	2.35%
	% premaligno	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%		% premaligno	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	% maligno	4.01%	8.25%	14.15%	20.97%	39.69%		% maligno	4.46%	8.76%	15.41%	22.26%	38.64%
	% neoplasia	0.05%	0.12%	0.14%	0.22%	1.80%		% neoplasia	0.03%	0.09%	0.13%	0.44%	1.39%
	% cin1	0.00%	2.10%	5.27%	7.98%	15.27%		% cin1	0.00%	2.26%	6.02%	7.59%	14.75%
I n d	% cin2	0.00%	2.05%	5.24%	7.79%	14.62%	I n d	% cin2	0.00%	2.07%	5.77%	7.50%	13.88%
	% cin3	0.00%	0.38%	3.57%	5.10%	9.62%		% cin3	0.00%	0.92%	3.02%	4.88%	9.35%
	% precáncer	0.00%	0.01%	1.02%	2.70%	5.51%		% precáncer	0.00%	0.00%	0.87%	2.15%	5.19%
	% cáncer	0.00%	0.00%	0.00%	0.31%	1.57%		% cáncer	0.00%	0.00%	0.00%	0.11%	0.72%
	IL-12	235.73	541.88	1075.00	1930.63	6240.50		IL-12	223.57	518.80	1030.27	1972.65	6210.83
	CTLs	7.27	8.32	10.97	30.18	37.93		CTLs	7.20	8.72	9.13	30.73	36.23
	T	Dosis vacunas x paciente	1.00	1.00	1.00	1.75		3.00	T	Dosis vacunas x paciente	1.00	1.00	1.00

Tabla 5.1.4: Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE EXP.4: VACUNA DC=1000, DOSIS=3, INTERVALO=2 semanas						
HPV16-ALIFE		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
P r o t e i n a s	E1	38.34%	42.11%	48.30%	55.46%	64.41%
	E2	22.13%	24.25%	27.19%	28.51%	29.86%
	E4	1.41%	3.09%	5.49%	8.27%	17.53%
	E5	2.35%	4.87%	7.69%	9.54%	13.04%
	E6	1.37%	2.52%	4.61%	6.44%	13.61%
	E7	1.41%	2.45%	4.50%	6.40%	11.78%
	L1	2.17%	5.40%	11.68%	13.04%	23.41%
T r a n s i c i o n e s	L2	1.91%	4.69%	10.22%	14.87%	20.12%
	% infectados	2.20%	5.00%	8.73%	10.81%	16.95%
	% mutación	0.41%	0.42%	0.56%	0.79%	3.18%
	% premaligno	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%
	% maligno	5.29%	10.80%	19.38%	23.61%	39.70%
	% neoplasia	0.03%	0.05%	0.08%	0.34%	3.07%
	% cin1	0.00%	2.96%	7.90%	9.86%	14.46%
I n d	% cin2	0.00%	3.05%	8.08%	10.18%	13.65%
	% cin3	0.00%	1.01%	4.93%	6.26%	9.49%
	% precáncer	0.00%	0.00%	1.54%	3.30%	5.36%
	% cáncer	0.00%	0.00%	0.00%	0.11%	0.48%
T	IL-12	246.13	531.67	1058.57	3161.65	7491.53
	CTLs	7.67	8.98	10.23	29.40	32.93
T	Dosis vacunas x paciente	1.00	1.00	1.00	1.00	3.00

La [tabla 5.1.5](#), muestra los percentiles correspondientes a los experimentos realizados a pacientes con infección por HPV16+, que reciben entre una (1) y tres (3) dosis de vacuna con adyuvante, según lo especificado en el experimento tipo-5 (DC=10 + IL-2).

La [tabla 5.1.6](#), muestra los percentiles correspondientes a los experimentos realizados a pacientes con infección por HPV16+, que reciben entre una (1) y tres (3) dosis de vacuna con adyuvante, según lo especificado en el experimento tipo-6 (DC=10 + TLR3 (Poly I:C)).

La [tabla 5.1.7](#), muestra los percentiles correspondientes a los experimentos realizados a pacientes con infección por HPV16+, que reciben entre una (1) y tres (3) dosis de vacuna con adyuvante, según lo especificado en el experimento tipo-7 (DC=10 + TLR9 (CpG)).

Tabla 5.1.5: Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE EXP-5: VACUNA DC=10, DOSIS=3, INTERVALO=2 semanas. IL-2=Activa						
HPV16-ALIFE		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
P r o t e i n a s	E1	39.12%	42.53%	48.03%	55.51%	63.93%
	E2	20.84%	22.85%	28.12%	29.47%	30.71%
	E4	1.56%	3.49%	6.31%	7.64%	15.94%
	E5	0.75%	2.59%	5.22%	6.83%	13.78%
	E6	1.13%	2.34%	5.71%	7.75%	12.66%
	E7	0.95%	2.33%	4.05%	5.12%	11.47%
	L1	2.38%	8.44%	9.72%	10.08%	22.55%
	L2	1.22%	4.28%	7.26%	8.56%	19.01%
T r a n s i c i o n e s	% infectados	1.40%	4.04%	6.80%	8.34%	15.93%
	% mutación	0.05%	0.24%	0.45%	0.68%	2.67%
	% premaligno	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.30%
	% maligno	3.93%	9.02%	16.26%	20.38%	38.97%
	% neoplasia	0.03%	0.05%	0.09%	0.15%	0.83%
	% cin1	0.00%	2.37%	6.63%	6.98%	13.64%
	% cin2	0.00%	2.17%	5.80%	6.88%	13.44%
	% cin3	0.00%	1.57%	4.49%	4.64%	8.82%
I n d	% precáncer	0.00%	0.00%	1.21%	1.99%	4.48%
	% cáncer	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.65%
T	IL-12	235.27	515.52	1026.63	1866.08	6096.77
	CTLs	7.40	7.87	8.47	28.78	30.67
Dosis vacunas x paciente		1.00	1.00	1.00	1.00	3.00

Tabla 5.1.6: Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE EXP-6: VACUNA DC=10, DOSIS=3, INTERVALO=2 semanas. TLR3=Activo						
HPV16-ALIFE		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
P r o t e i n a s	E1	39.15%	43.18%	49.12%	56.67%	63.80%
	E2	21.67%	23.64%	26.74%	29.23%	30.61%
	E4	1.41%	2.72%	4.86%	7.77%	17.27%
	E5	0.75%	2.77%	6.32%	6.90%	13.89%
	E6	1.09%	4.51%	5.47%	7.20%	14.97%
	E7	1.13%	2.85%	4.58%	6.19%	13.61%
	L1	0.78%	6.86%	10.71%	11.23%	23.35%
	L2	0.46%	4.17%	8.96%	9.43%	19.90%
T r a n s i c i o n e s	% infectados	0.59%	4.31%	7.71%	9.15%	17.00%
	% mutación	0.02%	0.25%	0.75%	0.80%	2.77%
	% premaligno	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.30%
	% maligno	3.63%	8.53%	16.24%	21.55%	40.85%
	% neoplasia	0.03%	0.04%	0.06%	0.22%	0.66%
	% cin1	0.00%	1.93%	7.40%	7.75%	15.80%
	% cin2	0.00%	1.63%	7.60%	7.89%	16.00%
	% cin3	0.00%	0.35%	3.82%	5.46%	11.80%
I n d	% precáncer	0.00%	0.00%	0.60%	3.17%	7.08%
	% cáncer	0.00%	0.00%	0.00%	0.60%	3.12%
T	IL-12	243.07	518.97	1058.50	1861.38	6068.17
	CTLs	8.33	9.28	9.60	35.12	41.93
Dosis vacunas x paciente		1.00	1.00	1.00	2.00	3.00

Tabla 5.1.7: Tasas reportadas por el modelo HPV16-ALIFE EXP-7: VACUNA DC=10, DOSIS=3, INTERVALO=2 semanas. TLR9=Activo						
HPV16-ALIFE		Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
P r o t e i n a s	E1	39.28%	43.21%	49.57%	55.00%	63.83%
	E2	22.82%	24.18%	26.76%	28.84%	30.47%
	E4	1.31%	4.13%	5.14%	8.13%	15.89%
	E5	0.61%	2.01%	4.21%	6.35%	14.26%
	E6	1.25%	2.61%	4.52%	6.49%	14.82%
	E7	1.06%	3.10%	5.34%	6.17%	14.59%
	L1	1.13%	4.20%	8.52%	10.45%	23.08%
	L2	1.53%	3.63%	7.20%	8.49%	19.78%
T r a n s i c i o n e s	% infectados	1.03%	3.76%	6.46%	8.08%	17.07%
	% mutación	0.02%	0.28%	0.46%	0.75%	6.12%
	% premaligno	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	% maligno	4.29%	12.73%	17.59%	21.09%	39.77%
	% neoplasia	0.03%	0.04%	0.06%	0.26%	0.66%
	% cin1	0.00%	2.00%	5.97%	7.19%	15.75%
	% cin2	0.00%	1.69%	5.31%	6.76%	15.63%
	% cin3	0.00%	0.55%	2.82%	4.45%	12.59%
I n d	% precáncer	0.00%	0.00%	1.02%	2.31%	7.12%
	% cáncer	0.00%	0.00%	0.00%	0.42%	2.95%
T	IL-12	247.10	533.92	1061.53	1873.48	6071.00
	CTLs	8.53	9.22	10.80	33.48	38.67
Dosis vacunas x paciente		1.00	1.00	1.00	2.00	3.00

5.1.2.1. Experimentos tipo-1

La [figura 5.4.1](#), muestra los resultados obtenidos de la simulación bajo las condiciones del experimento tipo-1 (sin vacuna).

En conjunto, y bajo las condiciones del experimento tipo-1, en promedio los pacientes que no recibieron vacunas desarrollaron lesiones CIN1, con tasas medias de 8.82% y tasas máximas 30.76%; lesiones CIN2, con tasas medias de 8.76% y tasas máximas de 30.13%; lesiones CIN3, con tasas medias de 5.15%, y tasas máximas de 28.10%; condiciones de pre-cáncer,

con tasas medias de 2.59% y tasas máximas de 25.65%; y condiciones de cáncer, con tasas máximas de 18.86%. Los niveles de expresión de la oncoproteína E6, reportan tasas medias de 5.05%, y tasas máximas de 31.52%; y la oncoproteína E7, reporta tasas medias de 5.04%, y tasas máximas de 31.58%.

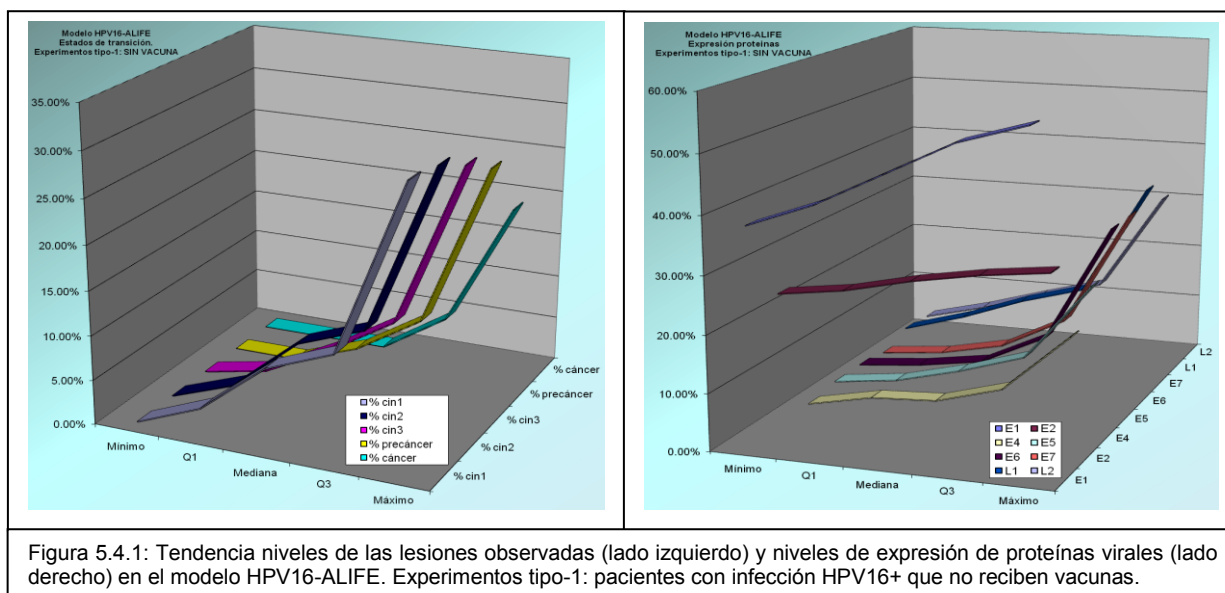


Figura 5.4.1: Tendencia niveles de las lesiones observadas (lado izquierdo) y niveles de expresión de proteínas virales (lado derecho) en el modelo HPV16-ALIFE. Experimentos tipo-1: pacientes con infección HPV16+ que no reciben vacunas.

5.1.2.2. Experimentos tipo-2

La [figura 5.4.2](#), muestra los resultados obtenidos de la simulación bajo las condiciones del experimento tipo-2 (vacuna sin adyuvante con carga DC=10). Frente a las tres (3) dosis programadas, el modelo aplica en promedio 1.40 dosis de vacuna al grupo de pacientes evaluados en fase I; 1.20 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase II; y 1.40 dosis de la vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase III.

Cuando la simulación se inició con todas las proteínas en estado activo, el modelo aplicó a algunos pacientes tres (3) dosis, a otros dos (2) y otros solo recibieron una (1) dosis. Esto mismo sucedió cuando se inició la simulación con la proteína E6 en estado inactivo. En cambio, cuando se inició la simulación con la proteína E7 en estado inactivo, el modelo solo requirió aplicar entre una (1) y dos (2) dosis, es decir, en este caso no requirió aplicar las tres (3) dosis.

En conjunto, y bajo las condiciones del experimento tipo-2, en promedio los pacientes recibieron 1.33 dosis de vacuna, variando su aplicación entre las semanas 209 y 216, con lo cual se lograron reducir las condiciones de pre-cáncer, con una tasa máxima reportada de 5.63%; y condiciones de cáncer, con una tasa máxima reportada de 1.81%.

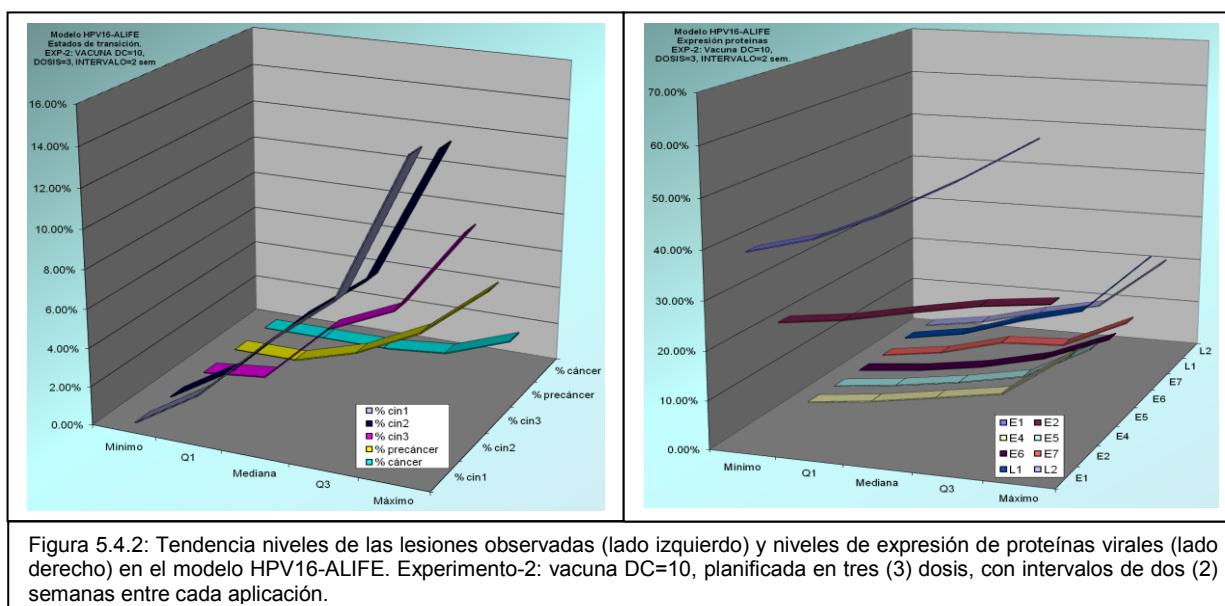


Figura 5.4.2: Tendencia niveles de las lesiones observadas (lado izquierdo) y niveles de expresión de proteínas virales (lado derecho) en el modelo HPV16-ALIFE. Experimento-2: vacuna DC=10, planificada en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre cada aplicación.

5.1.2.3. Experimentos tipo-3

La [figura 5.4.3](#), muestra los resultados obtenidos de la simulación bajo las condiciones del experimento tipo-3 (vacuna sin adyuvante con carga DC=100). Frente a las tres (3) dosis programadas, el modelo aplica en promedio 1.30 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluados en fase I; una (1) dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluados en fase II; y 1.30 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase III.

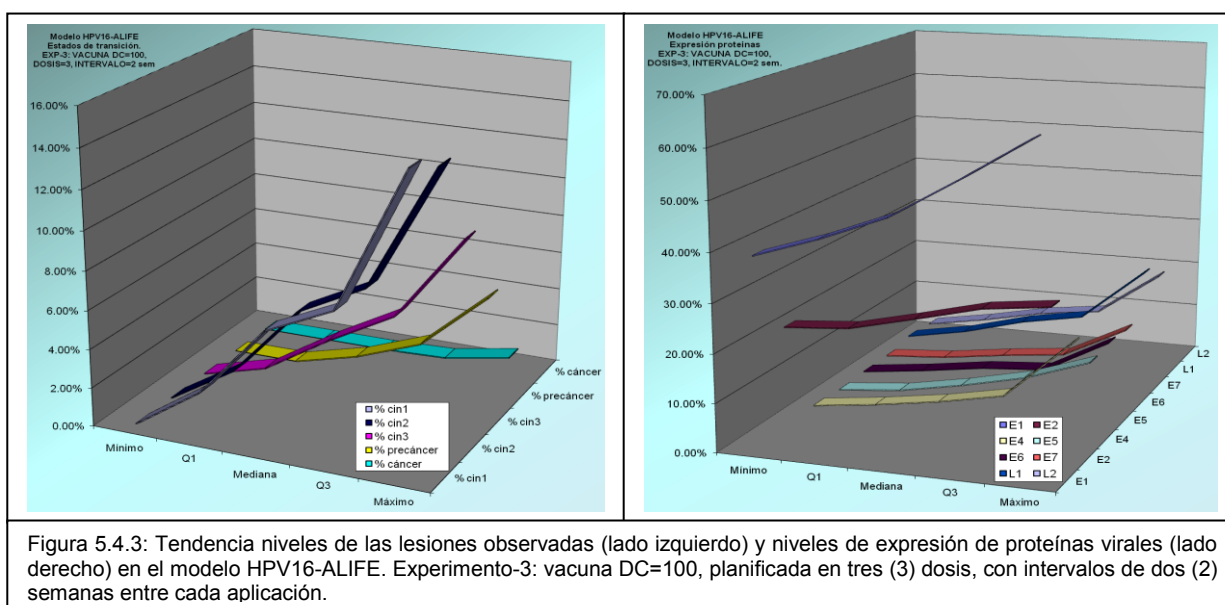


Figura 5.4.3: Tendencia niveles de las lesiones observadas (lado izquierdo) y niveles de expresión de proteínas virales (lado derecho) en el modelo HPV16-ALIFE. Experimento-3: vacuna DC=100, planificada en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre cada aplicación.

Cuando la simulación se inició con todas las proteínas en estado activo, el modelo solo requirió aplicar entre una (1) y dos (2) dosis, es decir, en este caso no requirió aplicar las tres (3) dosis. Cuando se inició la simulación con la proteína E7 en estado inactivo, el modelo solo requirió aplicar una (1) dosis. Cuando se inició la simulación con la proteína E6 en estado inactivo, el modelo requirió la aplicación entre una (1), dos (2) y tres (3) dosis, en distintos pacientes.

En conjunto, y bajo las condiciones del experimento tipo-3, en promedio los pacientes recibieron 1.20 dosis de vacuna, variando su aplicación entre las semanas 209 y 221, con lo cual se lograron reducir las condiciones de pre-cáncer, con una tasa máxima reportada de 5.19%; y condiciones de cáncer, con una tasa máxima reportada de 0.72%.

5.1.2.4. Experimentos tipo-4

La [figura 5.4.4](#), muestra los resultados obtenidos de la simulación bajo las condiciones del experimento tipo-4 (vacuna sin adyuvante con carga DC=1000). Frente a las tres (3) dosis programadas, el modelo aplica en promedio una (1) dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluados en fase I; 1.50 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase II; y 1.30 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase III.

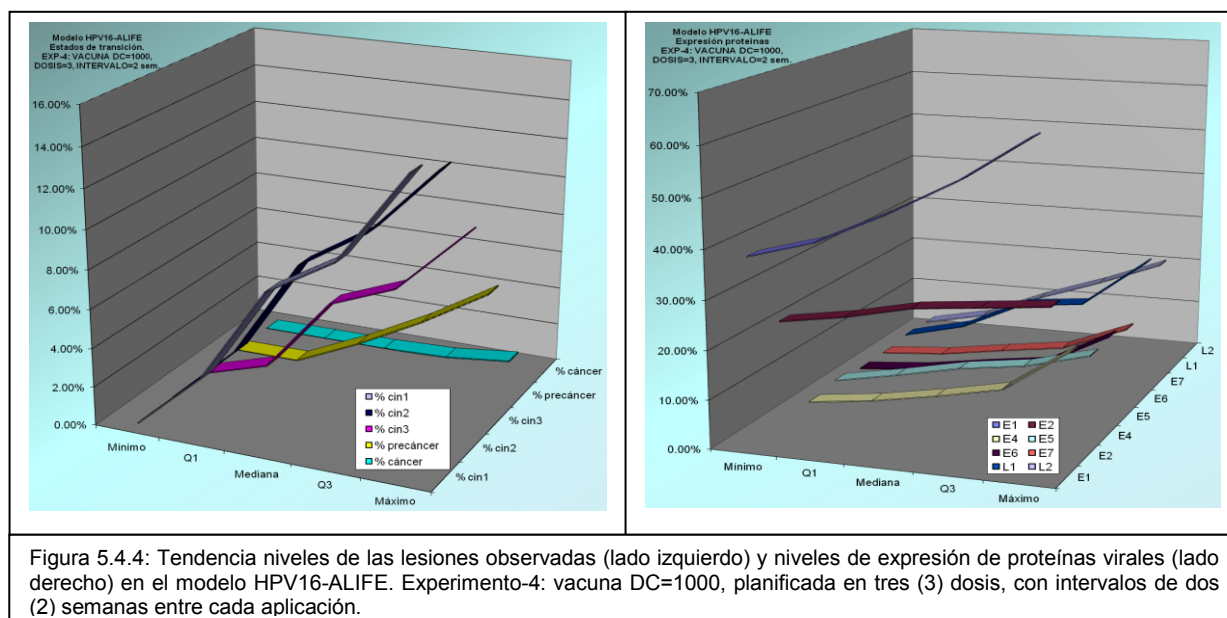


Figura 5.4.4: Tendencia niveles de las lesiones observadas (lado izquierdo) y niveles de expresión de proteínas virales (lado derecho) en el modelo HPV16-ALIFE. Experimento-4: vacuna DC=1000, planificada en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre cada aplicación.

Cuando la simulación se inició con todas las proteínas en estado activo, el modelo requirió aplicar solo una (1) dosis. Cuando se inició la simulación con la proteína E7 en estado inactivo, el modelo solo requirió aplicar entre una (1) y dos (2) dosis. Cuando se inició la simulación con la proteína E6 en estado inactivo, el modelo requirió la aplicación entre una (1), dos (2) y tres (3) dosis, en distintos pacientes.

En conjunto, y bajo las condiciones del experimento tipo-4, en promedio los pacientes recibieron 1.27 dosis de vacuna, variando su aplicación entre las semanas 209 y 218, con lo cual se lograron reducir las condiciones de pre-cáncer, con una tasa máxima reportada de 5.36%; y condiciones de cáncer, con una tasa máxima reportada 0.48%.

5.1.2.5. Experimentos tipo-5

La [figura 5.4.5](#), muestra los resultados obtenidos de la simulación bajo las condiciones del experimento tipo-5 (vacuna con adyuvante con carga DC=10 con IL-2). Frente a las tres (3) dosis programadas, el modelo aplica en promedio 1.50 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluados en fase I; 1.10 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase II; y 1.20 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluados en fase III.

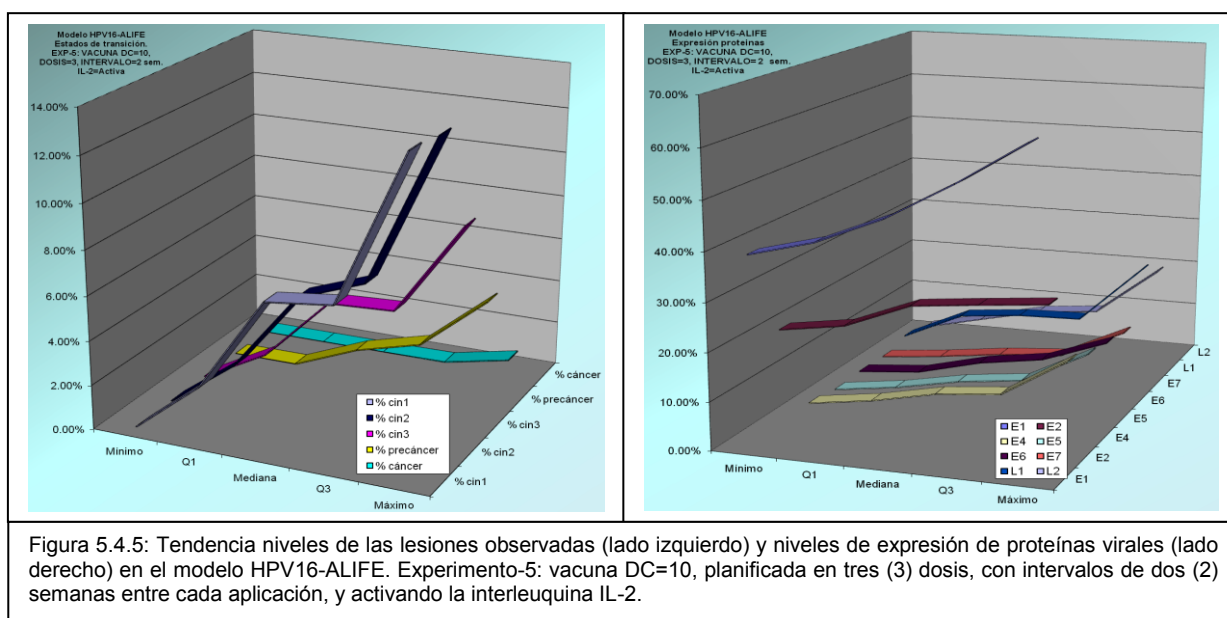


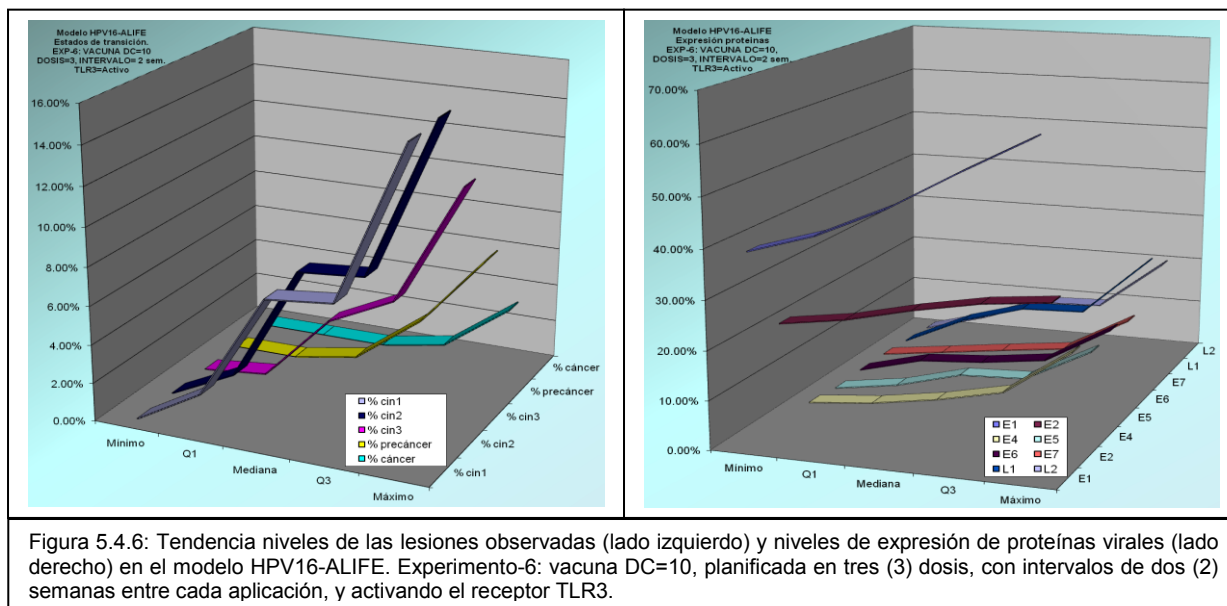
Figura 5.4.5: Tendencia niveles de las lesiones observadas (lado izquierdo) y niveles de expresión de proteínas virales (lado derecho) en el modelo HPV16-ALIFE. Experimento-5: vacuna DC=10, planificada en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre cada aplicación, y activando la interleuquina IL-2.

Cuando la simulación se inició con todas las proteínas en estado activo, el modelo requirió la aplicación entre una (1), dos (2) y tres (3) dosis, en distintos pacientes. Cuando se inició la simulación con la proteína E7 en estado inactivo, el modelo solo requirió aplicar entre una (1) y dos (2) dosis, y lo mismo sucedió cuando se inició la simulación con la proteína E6 en estado inactivo.

En conjunto, y bajo las condiciones del experimento tipo-5, en promedio los pacientes recibieron 1.27 dosis de vacuna, variando su aplicación entre las semanas 209 y 221, con lo cual se lograron reducir solo en bajo grado las condiciones de pre-cáncer, con una tasa máxima reportada de 16.33%; y reducir de forma importante las condiciones de cáncer, con una tasa máxima reportada de 0.65%.

5.1.2.6. Experimentos tipo-6

La [figura 5.4.6](#), muestra los resultados obtenidos de la simulación bajo las condiciones del experimento tipo-6 (vacuna con adyuvante y carga DC=10 con Poly (I:C)). Frente a las tres (3) dosis programadas, el modelo aplica en promedio 1.30 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluados en fase I; 1.80 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase II; y 1.70 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase III.



Cuando la simulación se inició con todas las proteínas en estado activo, el modelo solo requirió aplicar entre una (1) y dos (2) dosis. Cuando se inició la simulación con la proteína E7 en estado inactivo, el modelo solo requirió aplicar entre una (1), dos (2) y tres (3) dosis, en distintos pacientes, y lo mismo sucedió cuando se inició la simulación con la proteína E6 en estado inactivo.

En conjunto, y bajo las condiciones del experimento tipo-6, en promedio los pacientes recibieron 1.60 dosis de vacuna, variando su aplicación entre las semanas 209 y 219, con lo cual se lograron reducir en bajo grado las condiciones de pre-cáncer, con una tasa máxima reportada de 7.08%; y condiciones de cáncer, con una tasa máxima reportada de 3.12%.

5.1.2.7. Experimentos tipo-7

La [figura 5.4.7](#), muestra los resultados obtenidos de la simulación bajo las condiciones del experimento tipo-7 (vacuna con adyuvante y carga DC=10 con CpG). Frente a las tres (3) dosis programadas, el modelo aplica en promedio 1.60 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluados en fase I; 1.30 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase II; y 1.40 dosis de vacuna, al grupo de pacientes evaluado en fase III.

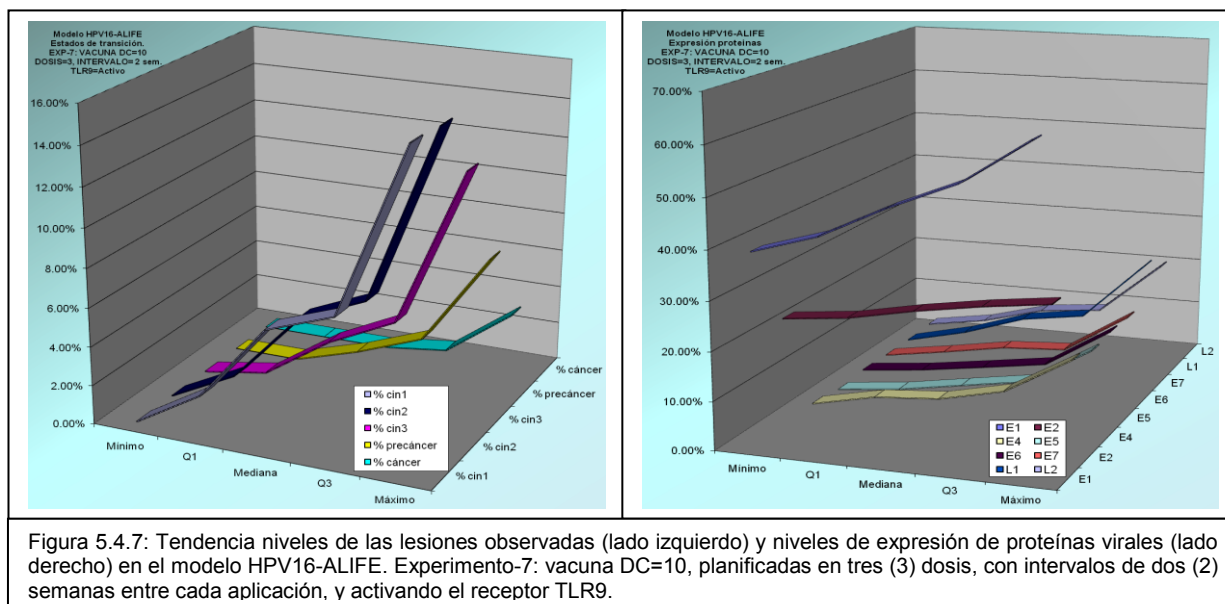


Figura 5.4.7: Tendencia niveles de las lesiones observadas (lado izquierdo) y niveles de expresión de proteínas virales (lado derecho) en el modelo HPV16-ALIFE. Experimento-7: vacuna DC=10, planificadas en tres (3) dosis, con intervalos de dos (2) semanas entre cada aplicación, y activando el receptor TLR9.

Cuando la simulación se inició con todas las proteínas en estado activo, el modelo requirió aplicar una (1), dos (2) y tres (3) dosis, en distintos pacientes, y lo mismo sucedió cuando se inició la simulación con la proteína E7 en estado inactivo, y también cuando se inició la simulación con la proteína E6 en estado inactivo. Es decir, en promedio en ninguno de los tres (3) escenarios previstos, se logró controlar con menos de tres (3) dosis.

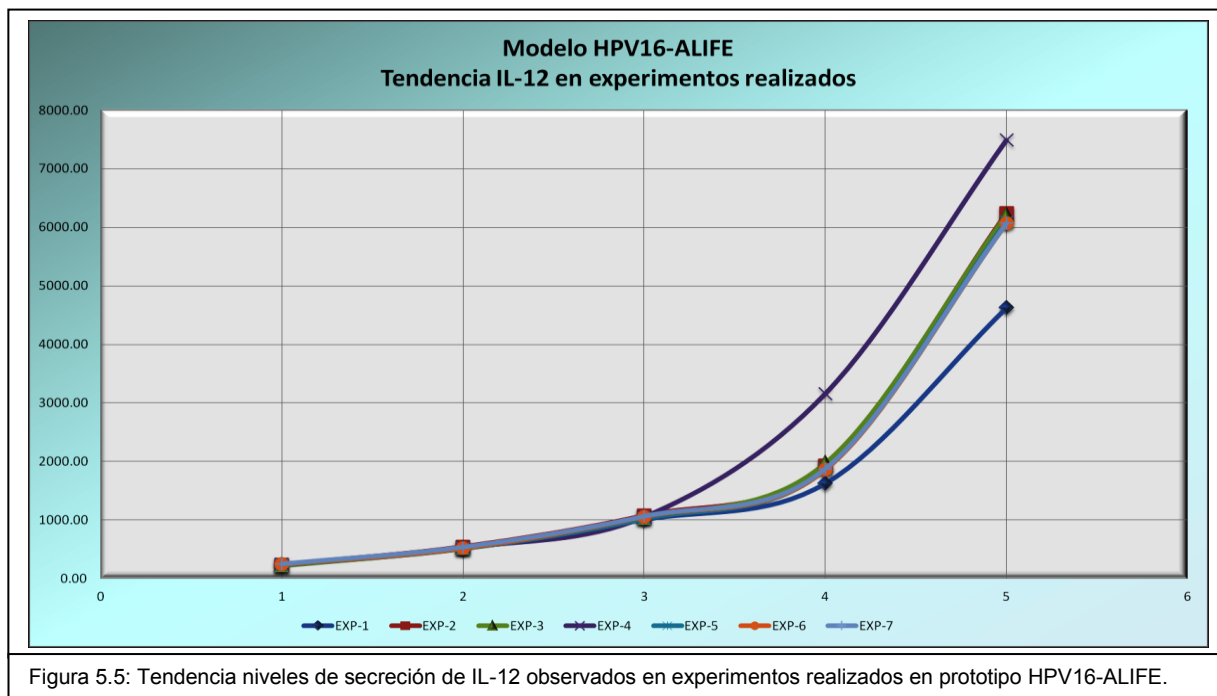
En conjunto, y bajo las condiciones del experimento tipo-7, en promedio los pacientes recibieron 1.43 dosis de vacuna, variando su aplicación entre las semanas 209 y 217, con lo cual se lograron reducir las condiciones de pre-cáncer, con una tasa máxima reportada de 7.12%; y condiciones de cáncer, con una tasa máxima reportada de 2.95%.

5.1.3. Análisis de tendencia experimentos realizados en HPV16-ALIFE

Debido a que no se cuenta con un modelo computacional que simule las mismas interacciones que plantea el modelo y que permita confrontar los resultados, se buscaron ensayos clínicos específicos en pacientes del mundo real, procurando comparar el componente de forma individual, más no el modelo en su totalidad. Sin embargo, esta labor se dificulta por la misma circunstancia que ya han referido otros autores previamente, básicamente porque resulta difícil comparar los resultados de diferentes estudios, teniendo en cuenta que se realizan con diferentes características de rendimiento, sensibilidad y puntos de corte, además de las diferencias aportadas por el diseño del estudio, definiciones de seropositividad, estrategias de análisis (Stanley, 2012), y tiempo de duración del seguimiento. Es por ello, que las comparaciones frente a algunos estudios, se realiza únicamente a nivel de tendencia.

5.1.3.1. Tendencia IL-12

La [figura 5.5](#), muestra el comportamiento de los niveles de secreción que reporta la interleuquina doce (IL-12), frente al desafío que implica cada una de las estrategias de vacunación probadas en el modelo HPV16-ALIFE. Entre los siete (7) tipos de experimentos realizados, el experimento tipo-4 reporta los niveles más altos de secreción y el experimento tipo-1 los niveles más bajos de IL-12.



Algunos estudios clínicos que evalúan vacunas con células dendríticas cargadas de antígeno, también reportan incremento en la expresión de IL-12 (Rainone et al., 2016; Wang H.L. et al., 2014). En particular, el trabajo de Wang y colegas, reporta un significativo incremento de IL-12 después del tratamiento con DCs cargadas de antígeno E7 con CpG-ODN (Wang H.L. et al., 2014).

5.1.3.2. Tendencia población CTLs

La [figura 5.6](#), muestra el comportamiento en los niveles de proliferación de la población de linfocitos T citotóxicos (CTLs) frente al desafío que implica cada una de las estrategias de vacunación probadas en el modelo HPV16-ALIFE. Entre los seis (6) experimentos realizados con vacunación, el experimento tipo-6 reporta los mayores niveles de proliferación de esta población celular, y el experimento tipo-5 los niveles más bajos. No obstante, en todos los experimentos con vacunas DC se incrementa la población de CTLs.

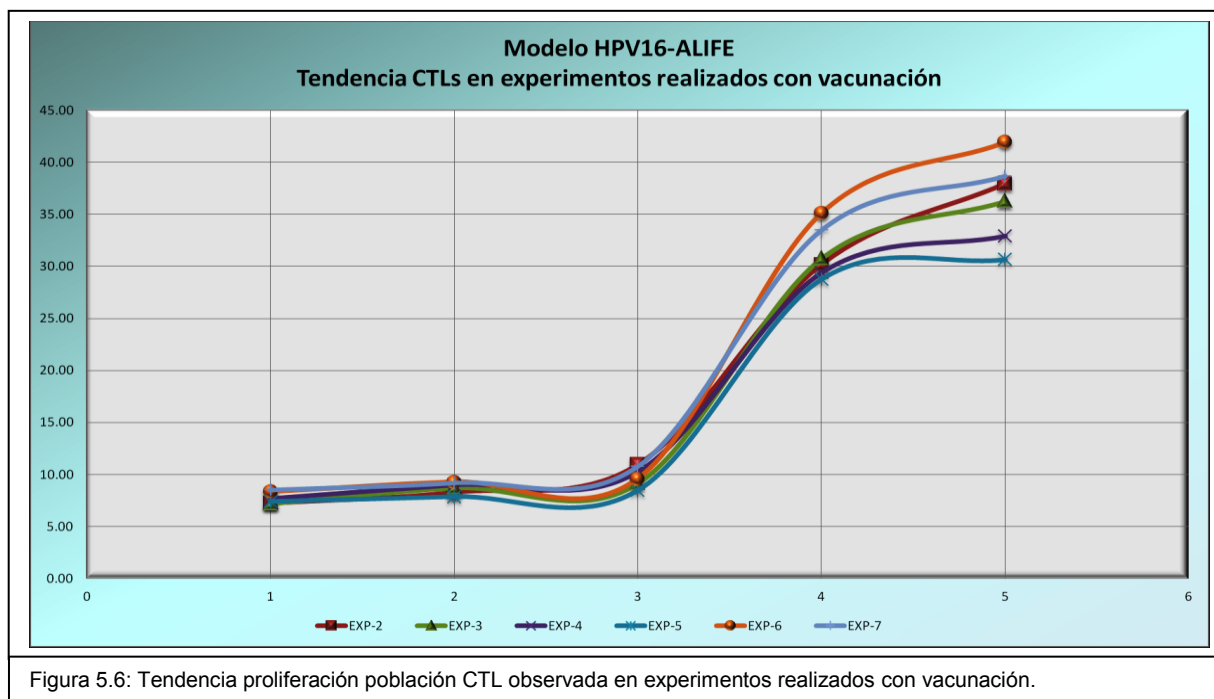


Figura 5.6: Tendencia proliferación población CTL observada en experimentos realizados con vacunación.

Wu y colegas (Wu et al., 2014), hacen uso de una vacuna DC que utiliza una proteína de fusión E6/E7 clonada a partir de células humanas de cáncer cervical, para estimular la respuesta de la población de CTLs. Este estudio muestra, que luego de aplicar la vacuna se incrementa la población CTL de forma importante, induciendo significativos niveles de apoptosis en células cancerosas.

El modelo HPV16-ALIFE, también muestra una creciente población de CTLs cuando se ve influenciada por los efectos de las vacunas DCs, tal como se observa en la [figura 5.6](#), lo cual permite generar condiciones de apoptosis que inducen la reducción de las células cancerosas.

La [figura 5.7](#), muestra el comportamiento de los niveles de proliferación de la población de linfocitos T citotóxicos (CTLs), frente al desafío que representan las vacunas con adyuvantes probadas en el modelo. Todas las vacunas con adyuvante, utilizan igual carga DCs pero diferente adyuvante. La gráfica también muestra la tendencia cuando se aplica una (1), dos (2) o tres (3) dosis, según lo establezca el modelo, de acuerdo con las condiciones del microambiente simulado.

Cuando se utiliza como adyuvante IL-2, en fase I (todos los interruptores de proteínas inician en estado activo), el modelo aplica como máximo las tres (3) dosis programadas, y el mayor nivel de proliferación CTL se observa cuando aplica las tres (3) dosis. Tanto en la fase II (interruptor E7 inicia en estado inactivo), como en la fase III (interruptor E6 inicia en estado inactivo), el modelo aplica como máximo solo dos (2) de las tres (3) dosis programadas.

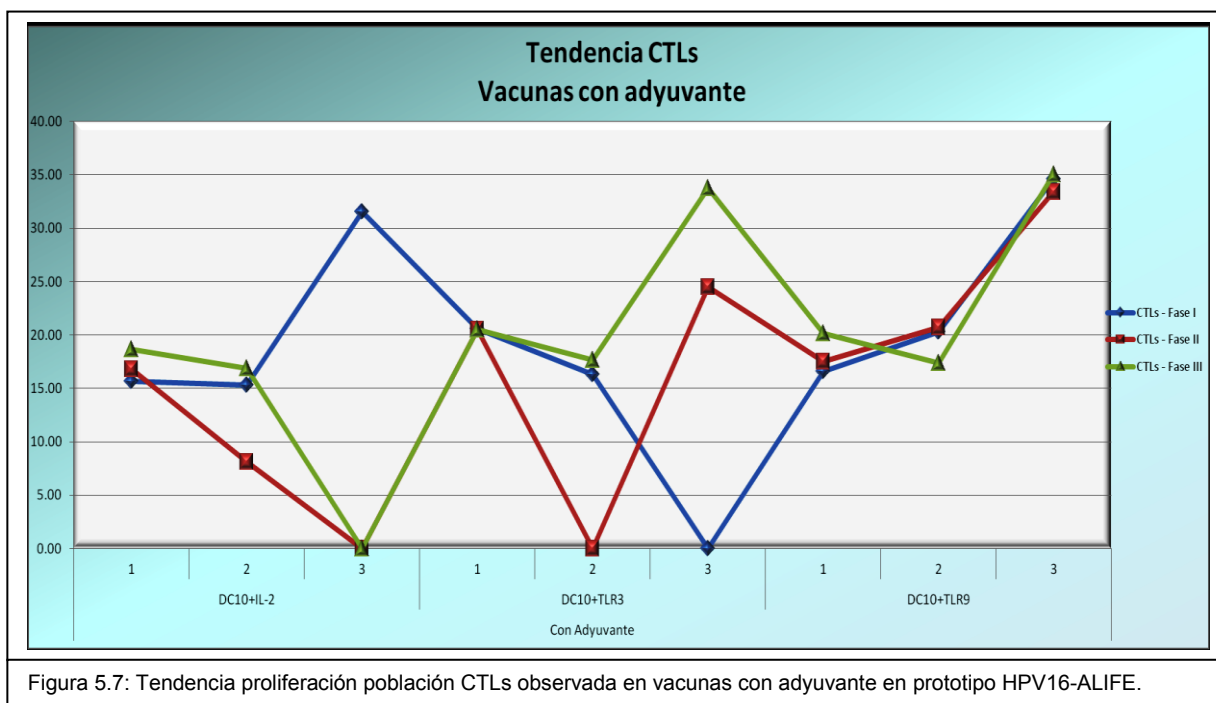


Figura 5.7: Tendencia proliferación población CTLs observada en vacunas con adyuvante en prototipo HPV16-ALIFE.

Cuando se utiliza como adyuvante un agonista TLR3, en fase I, el modelo solo aplica dos (2) de tres (2) dosis programadas. En fase II, aplica una (1) o tres (3) dosis, nunca dos (2). En fase III, el modelo aplica como máximo las tres (3) dosis.

Cuando se utiliza como adyuvante un agonista TLR9, en las tres (3) fases se aplican como máximo las tres (3) dosis programadas de la vacuna. El mayor nivel de proliferación de la población CTL se observa en fase III, es decir, cuando se inicia la simulación con la proteína E6 en estado inactivo, y cuando se aplican las tres (3) dosis de la vacuna.

Al comparar el nivel de proliferación de la población de CTLs, inducida entre los tres (3) tipos de vacunas con adyuvantes utilizadas en el modelo, en promedio el agonista TLR9 induce el mayor nivel, en segundo lugar TLR3 y luego IL-2.

Chang L.S. y colegas (Chang L.S. et al., 2014), demuestran que un agonista TLR9 (CpG ODN) mejora las respuestas CTL y erradica grandes tumores, cuando se combina con una forma mutante recombinante de E7 (rIipo-E7m) para tratar enfermedades asociadas con HPV16.

Wick y colegas (Wick et al., 2011), prueban una vacuna (Pentaxim), basada en proteína de fusión recombinante, que contiene oncoproteínas E7 a partir de cinco (5) genotipos HPV de alto riesgo, entre los que se encuentra HPV16, en combinación con un agonista TLR3 (poly(I:C)), o agonista TLR9 (CpG), suministrada a ratones por medio de una estrategia de inmunización. Este estudio muestra que la vacuna es capaz de provocar fuertes respuestas de células-T CD8 contra el antígeno E7 mediante la proteína recombinante y el agonista TLR3 (poly(I:C)) o el agonista TLR9 (CpG).

Lin CT y colegas (Lin CT. et al., 2007), prueban una vacuna DNA que codifica una fusión de proteínas E7 e IL-2, y muestran que las células-T CD8+ fueron responsables de la generación de efectos antitumorales inducidas por la vacuna, y observan que el vínculo de IL-2 por el antígeno E7 mejora las respuestas inmunes de células-T CD8+, así como también los efectos anti-tumorales de la vacuna DNA.

Los resultados de estos estudios coinciden con las tendencias observadas en las simulaciones realizadas en el modelo HPV16-ALIFE.

5.1.3.3. Tendencia expresión proteínas E6 y E7

Las [figura 5.8](#) y [figura 5.9](#), muestran el comportamiento de los niveles de expresión de las proteínas virales E6 y E7 de HPV16, respectivamente, frente a cada uno de los experimentos realizados. Los mayores niveles de expresión, tanto de la proteína E6 como de la proteína E7, son reportados en el experimento tipo-1, es decir, cuando no se aplica vacuna. En los demás experimentos que implican el desafío de una vacuna DC, los niveles de expresión de estas proteínas descienden.

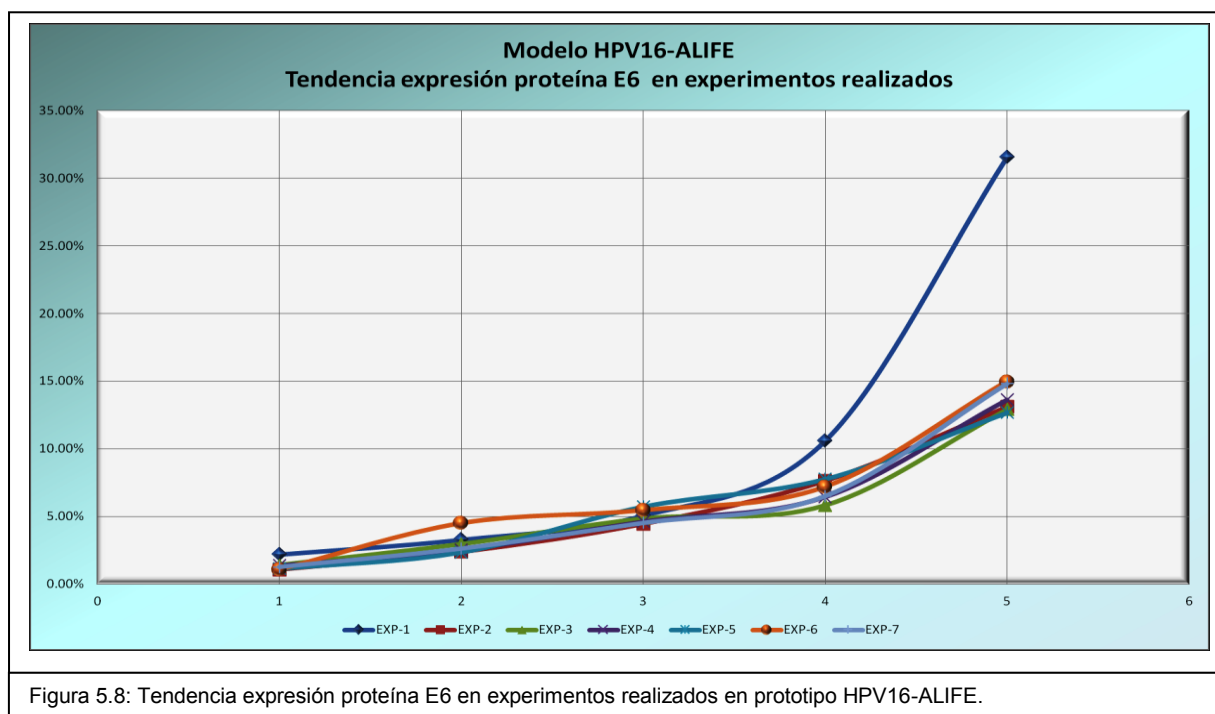
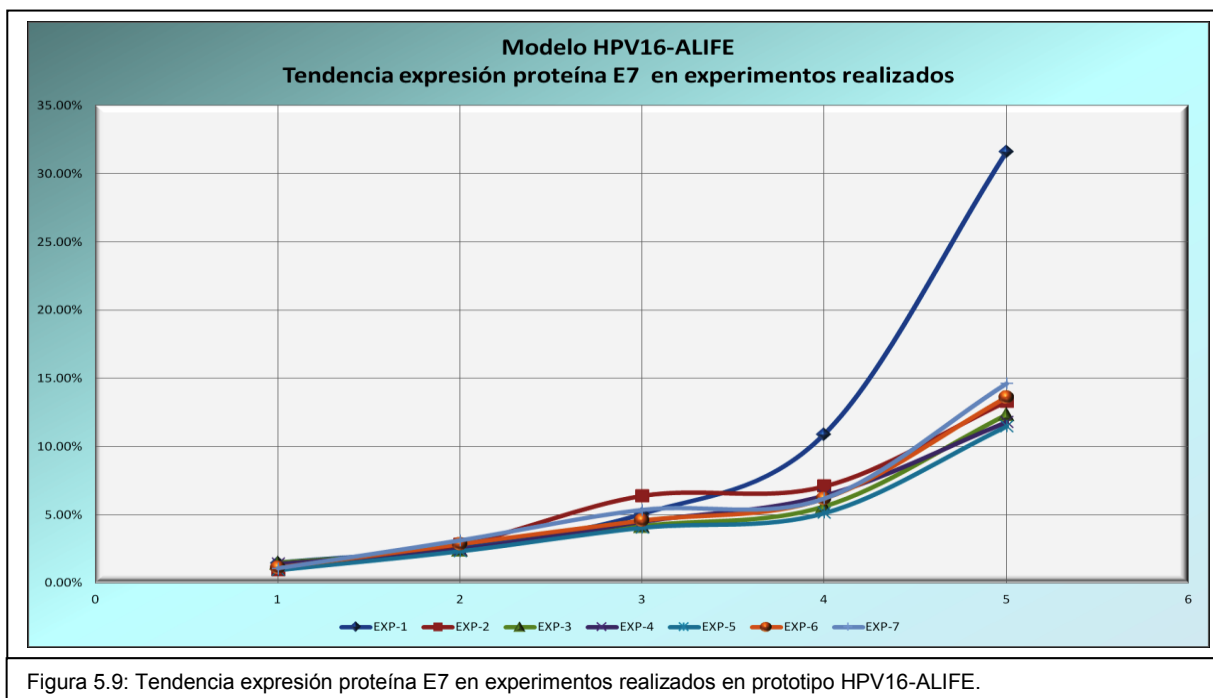


Figura 5.8: Tendencia expresión proteína E6 en experimentos realizados en prototipo HPV16-ALIFE.

Wu y colegas (Wu et al., 2014), produjeron una vacuna DC transfectada *in-vitro* con proteína de fusión E6/E7 de HPV16, clonada a partir de células humanas de cáncer cervical, para ser probada en ratones. Su estudio muestra que la vacuna afectó la viabilidad y morfología de las células de cáncer, debido a que la vacuna DC pAd-E6/E7 indujo apoptosis mediante la reducción de la expresión de las proteínas virales E6 y E7. Concluyen que su vacuna fue capaz de desencadenar inmunidad protectora específica contra el crecimiento de células de cáncer cervical.



Similar comportamiento se observa, en las simulaciones realizadas, tanto en el comportamiento de las proteínas E6 y E7, como en el control de células cancerosas.

5.1.4. Análisis de eficacia vacunas terapéuticas en HPV16-ALIFE

Halloran y colegas (Halloran et al., 2010), definen la eficacia de la vacuna por susceptibilidad a la enfermedad (VEsp), como la tasa que resulta entre el riesgo relativo de infección o enfermedad en los individuos vacunados, comparado contra los individuos no vacunados.

Con base en estos conceptos y utilizando los datos generados por cada uno de los experimentos corridos en el modelo HPV16-ALIFE, se calculan las tasas en cada fase y por cada tipo de lesión (CIN1, CIN2, CIN3, Pre-cáncer y Cáncer). Las [figura 5.10](#) y [figura 5.11](#), muestran la tendencia de la eficacia observada en las vacunas probadas en el modelo, sin adyuvante y con adyuvante, respectivamente. En las figuras, se reporta la tendencia del grupo que recibe el tipo de vacuna específica en cada una de las fases, pero no se observa el número de dosis que recibieron los pacientes en cada caso. Por lo tanto, este dato se suministra en el análisis correspondiente.

Entre los experimentos realizados con vacunas sin adyuvantes, donde se varía la carga DC, en condiciones de cáncer, la vacuna que mejor tasa de efectividad reporta (97.16%) es la vacuna con carga DC = 1,000. En condiciones de pre-cáncer, la vacuna que mejor tasa de efectividad reporta (74.83%), es la vacuna con carga DC = 100. En lesiones CIN3, la vacuna con mejor tasa de efectividad (55.48%), corresponde a la vacuna con carga DC = 100.

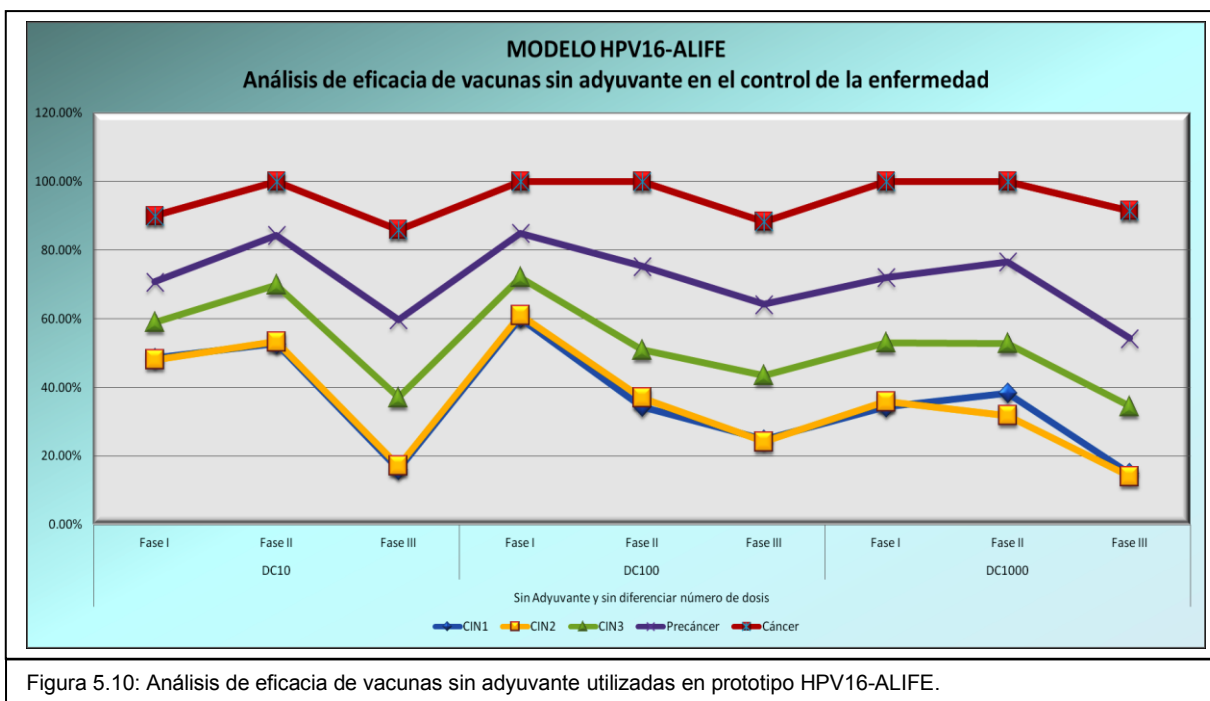


Figura 5.10: Análisis de eficacia de vacunas sin adyuvante utilizadas en prototipo HPV16-ALIFE.

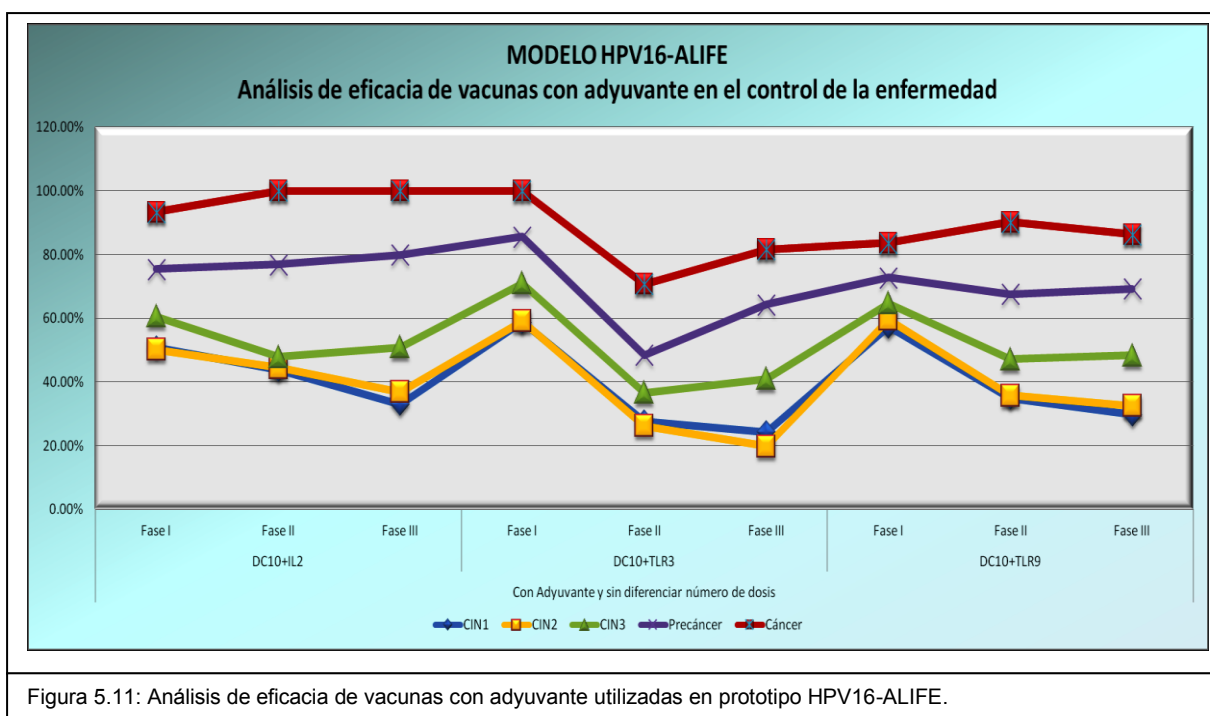
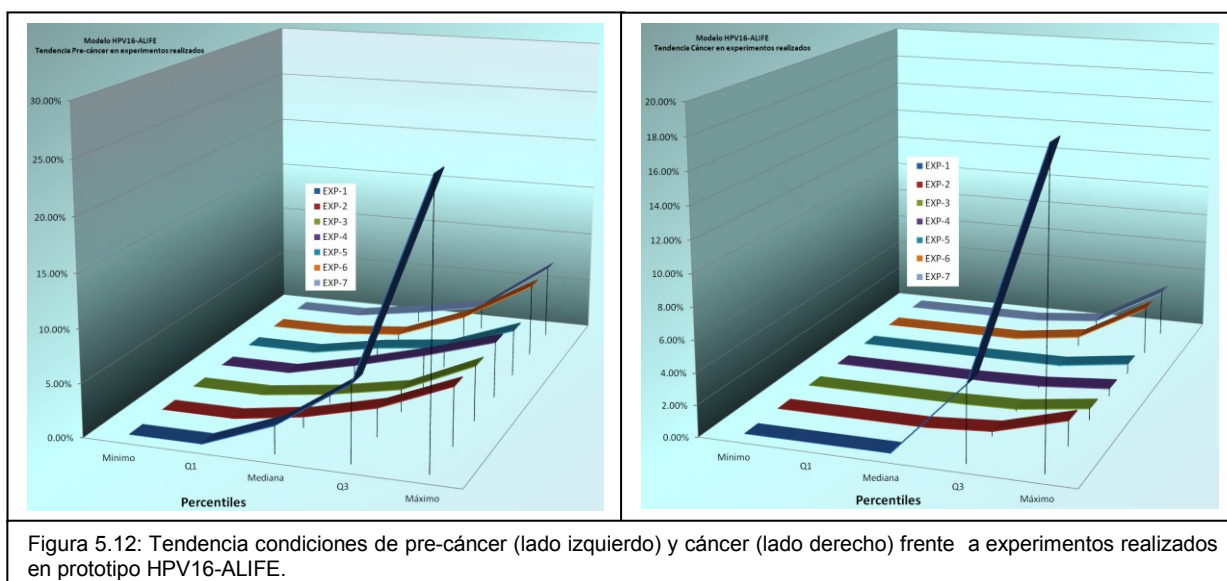


Figura 5.11: Análisis de eficacia de vacunas con adyuvante utilizadas en prototipo HPV16-ALIFE.

Entre los experimentos realizados con vacunas que utilizan adyuvantes, donde la carga DC es igual y se varía el adyuvante, en condiciones de cáncer, la vacuna que mejor tasa de efectividad reporta (97.77%) es la vacuna con adyuvante IL-2. En condiciones de pre-cáncer, la vacuna que mejor tasa de efectividad reporta (77.43%) es la vacuna con adyuvante IL-2. En lesiones CIN3, la vacuna con mejor tasa de efectividad (53.44%) corresponde a la vacuna con adyuvante TLR9.

La [figura 5.12](#), muestra la tendencia que se observa en el modelo frente a las condiciones de pre-cáncer y cáncer, con relación a cada tipo de experimento realizado en el modelo (sin vacuna, vacuna sin adyuvante y vacuna con adyuvante).



Al evaluar las tasas de efectividad a nivel de grupo, es decir, confrontando la efectividad de los tipos de vacunas sin adyuvante (variando la carga) y tipos de vacunas con adyuvante (variando el adyuvante), se obtiene la siguiente información.

Frente a la condición de cáncer, los experimentos realizados con vacunas sin adyuvantes, como grupo, reportan en promedio mejores tasas (95.08%) que las reportadas por las vacunas con adyuvantes (89.54%). Con relación a condiciones de pre-cáncer, los experimentos realizados en el prototipo con vacunas sin adyuvantes, como grupo, reportan en promedio mejores tasas (71.37%) que las reportadas por las vacunas con adyuvantes (71.14%).

De igual forma, la [figura 5.13](#) muestra la tendencia de las lesiones CIN frente a los siete (7) tipos de experimentos simulados en el prototipo HPV16-ALIFE.

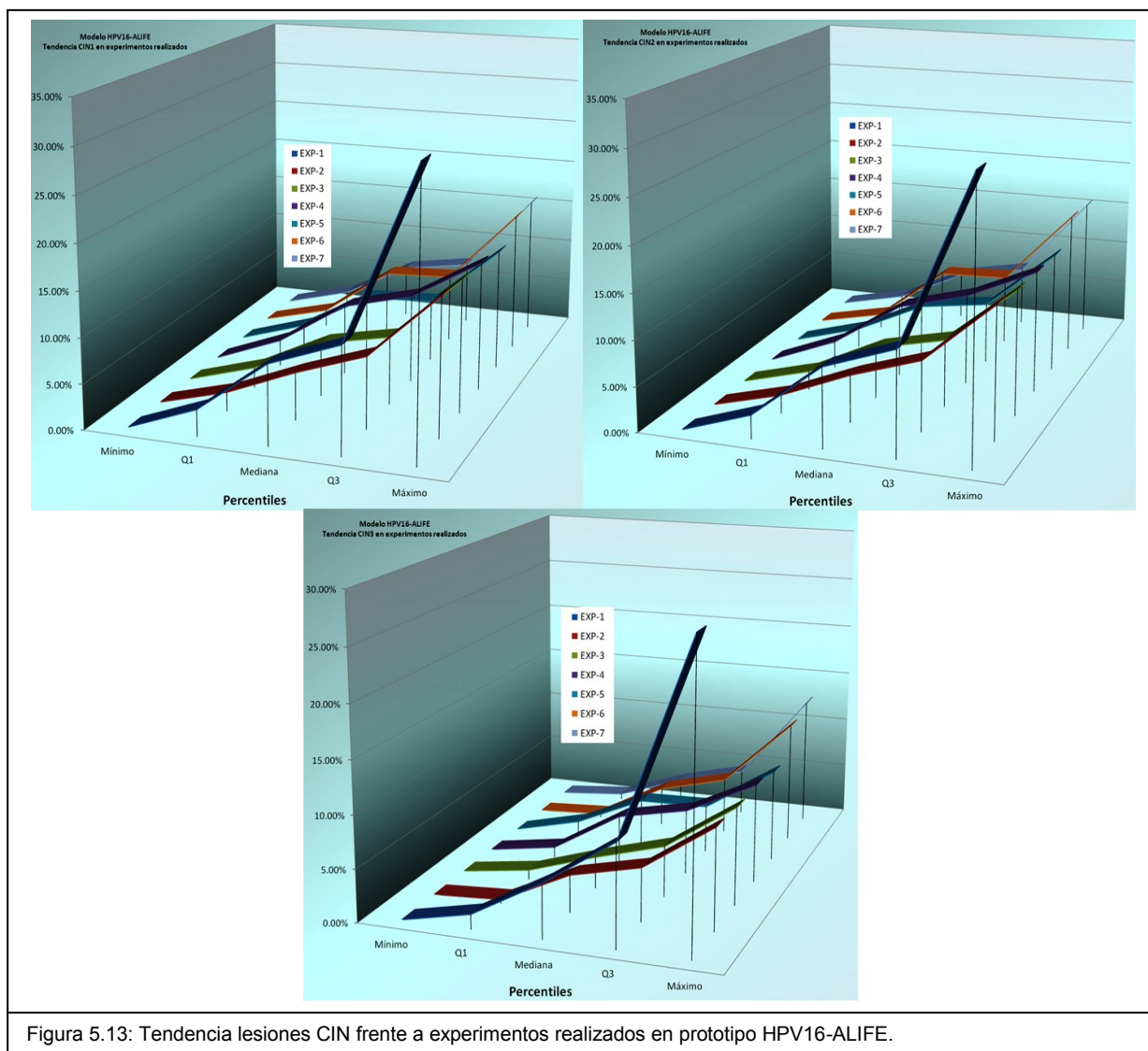


Figura 5.13: Tendencia lesiones CIN frente a experimentos realizados en prototipo HPV16-ALIFE.

En lesiones CIN3, los experimentos realizados en el prototipo con vacunas sin adyuvantes, como grupo, reportan en promedio mejores tasas (52.51%) que las reportadas por las vacunas con adyuvantes (52.05%).

Es importante hacer notar que la carga utilizada en vacunas con adyuvante corresponde a DC = diez (10) $\mu\text{g/mL}$, mientras que en vacunas sin adyuvante esta carga varía entre diez (10), cien (100) y mil (1000).

En resumen, los resultados a nivel grupo en vacunas sin adyuvante (variando cargas entre 10, 100 y 1000), reportan las tasas de efectividad más altas entre los experimentos realizados. No obstante, a nivel específico por tipo de vacuna, la tasa más alta en control de cáncer y pre-cáncer se reporta en vacuna con adyuvante IL-2. En cambio, la tasa más alta en control CIN3, a nivel específico se reporta en vacuna sin adyuvante.

5.2. RESUMEN DEL CAPÍTULO

En general, el modelo HPV16-ALIFE permite plantear diferentes tipos de experimentos a partir de los cuales se proporciona amplia información que luego hace parte de los análisis de tendencias, comportamientos grupales y comportamientos específicos por diferentes conceptos (tipo de vacuna, marcador biológico, población celular), tal como fue ilustrado en el ejercicio presentado.

Si bien los experimentos realizados se han enfocado en mediciones puntuales de componentes específicos, tratando de mostrar su potencial, realmente el modelo puede proporcionar mucha más información. Durante las diferentes simulaciones se puede observar el comportamiento de la mayoría de las poblaciones celulares que hacen parte del sistema inmune innato y adaptativo, se puede establecer el estado de actividad o inactividad de moléculas de superficie, nivel de secreción de múltiples citoquinas, estado de activación o inactivación de varios componentes que hacen parte de las vías de señalización TLR, y niveles de expresión de proteínas virales HPV16. Todos estos elementos incorporados en el modelo HPV16-ALIFE, tratan inicialmente de defender al huésped del estado infeccioso persistente causado por el virus, induciendo la activación de sus propios mecanismos de interacción, antes de hacer uso del estímulo que obtiene a partir de las vacunas programadas en los ensayos. Cuando este último evento se presenta, también se observa cómo las estrategias de vacunación entran a modificar los microambientes definidos en el modelo y cómo puede variar el comportamiento al usar una u otra estrategia.

Es importante aclarar, que aunque en los experimentos realizados se programaron tres (3) dosis como ejemplo, sólo cuando el sistema inmune agota sus recursos y detecta una creciente población de células cancerosas, hace uso efectivo de las vacunas terapéuticas, momento en el cual el modelo reporta que ha aplicado una dosis e indica la semana específica en que realiza la acción. Este mecanismo busca encontrar el momento adecuado y la dosis óptima de aplicación en procura de mitigar la condición de cáncer en el modelo.

Los resultados obtenidos y los análisis de tendencia evidenciados en las variables que se comparan frente a los estudios clínicos referidos previamente, permite evidenciar que el modelo de vida artificial propuesto genera comportamientos similares a los observados en la vida real.

VI CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

6.1. CONCLUSIONES

Con este trabajo se ha mostrado que, a pesar de algunos vacíos que la literatura reporta (por ejemplo, identificar la causa de la regresión espontánea en HPV o el mecanismo por el cual las células plasma localizan la médula ósea, entre otros), es posible correlacionar los componentes que participan en el sistema inmune, los objetivos que persigue frente a una infección persistente por HPV16 (que puede inducir una condición de cáncer cervical), y la estrategia de una vacuna terapéutica, vinculando todos estos componentes a través de reglas, interacciones, puntos de control, estados y transiciones, compilados en un modelo de vida artificial que refleja las acciones conocidas, a partir de las cuales pueden surgir los patrones de comportamiento esperados. Además, el modelo plantea la posibilidad de estimular y/o bloquear puntos críticos, sobrerregular poblaciones celulares específicas, brindando la posibilidad de observar los comportamientos que surgen a partir de estas interacciones en un mundo de vida artificial, donde probablemente los sesgos que se identifican en modelos animales, podrían ser mitigados; y los tiempos de prueba y evaluación primaria, podrían ser reducidos.

También es importante precisar, que si bien este modelo simula la interacción entre el sistema inmune innato y adaptativo, el ciclo de vida del HPV16 y la acción de una vacuna terapéutica, aún existen varios aspectos que continúan sin ser entendidos. No obstante, una vez la clínica confirme cualquiera de ellos, el modelo puede ser ajustado rápidamente, pero mientras ello sucede, las técnicas de vida artificial permiten su simulación, tal como se demuestra con el prototipo presentado.

Como modelo de vida artificial, se ha procurado incorporar con rigurosidad las características biológicas reportadas en la literatura y las que han sido reconocidas hasta el momento, en cada uno de los elementos que lo conforman, así como en las interacciones que surgen entre sus componentes. Si bien aún se tienen temas por dilucidar, relacionados con el sistema inmune y con el mismo ciclo de vida del HPV16, el modelo HPV16-ALIFE permite observar esta interacción y generar ensayos de prueba que ayudan a generar una primera aproximación de los posibles comportamientos resultantes.

Poder incorporar características y comportamientos biológicos al modelo de vida artificial propuesto, implicó el estudio juicioso por varios años, de cada uno de los componentes incorporados, tanto en condiciones normales, como en condiciones de infección viral persistente y desarrollo de cáncer. Parte de este estudio se traduce en los dos (2) libros anexos a este trabajo. Un primer libro (Anexo-1: Visión holística del sistema inmune humano), resume los antecedentes biológicos estudiados, frente a los componentes y mecanismos que hacen parte del sistema inmune humano (innato y adaptativo), en condiciones que podríamos denominar “normales”. Un segundo libro (Anexo-2: Visión holística del sistema inmune humano frente al virus de papiloma humano tipo 16), resume los antecedentes biológicos estudiados, frente a los componentes y mecanismos que hacen parte del sistema inmune

humano, pero en este caso, con un sesgo adicional que lo aporta el proceso infeccioso desencadenado por el virus HPV16, persistencia de la infección y desarrollo de cáncer cervical, especialmente.

Con el trabajo resumido en el primer libro, se procura conocer el origen de cada uno de los principales componentes que participan en el sistema inmune, partiendo desde definiciones conceptuales básicas, recorriendo las diferentes teorías que han aportado al conocimiento que actualmente se tiene de este complejo sistema, hasta particularizar sus características, mecanismos individuales e interacciones grupales. Se identifican las diferentes poblaciones celulares que se incorporan al modelo de vida artificial y también se describen mecanismos que muestran la maravilla de un sistema que trabaja en defensa del huésped. Se describe el proceso de diferenciación, proliferación y apoptosis, que sigue cada una de las poblaciones celulares que intervienen, las interacciones que surgen entre poblaciones celulares y su particular rol en la activación de mecanismos de defensa. Entre otros mecanismos que se detallan en este libro, se encuentra la descripción de hipermutación somática, recombinación de cambio de clase, maduración de afinidad, producción de anticuerpos, diferenciación de monocitos, células-B y células-T, citoquinas que actúan sobre cada población celular, moléculas y receptores asociados, y vías de señalización de sus principales receptores. Además, se describen en detalle los receptores Toll-like (TLRs), detallando su estructura, familia de adaptadores, vías de señalización y ciclo de vida. Igualmente, se trabaja en la descripción de las citoquinas, identificando cada uno de los miembros que hacen parte de cinco (5) diferentes familias, reconociendo sus mecanismos, interacciones e inhibidores de señalización.

Luego de realizar este trabajo, se busca comprender los aspectos inmunológicos que se desarrollan alrededor de una lesión causada por HPV16, entender los mecanismos que surgen entre el virus y el sistema inmune, y especialmente las condiciones de infección persistente y desarrollo de cáncer cervical, buscando con ello reconocer la dinámica que emerge. Es por esta razón que se desarrolla el segundo libro, en el cual se destacan aspectos que describen el virus, su ciclo de vida, y los cambios que se observan en diferentes poblaciones celulares debido a su interacción. Se describen en detalle estas interacciones, no solo desde la óptica del HPV16, sino también vistas desde las poblaciones celulares, receptores TLRs y citoquinas. Adicionalmente, se revisa la interacción de estos entornos frente al desarrollo de vacunas, tanto profilácticas como terapéuticas, enfatizando éstas últimas dado el interés que se tiene de ellas en el modelo que se propone.

Con base en este estudio previo, se trabajó en el reconocimiento de los diferentes agentes que participan en el modelo, en la identificación de interacciones claves, y en el hallazgo de patrones que permiten concebir un modelo conceptual que procura ajustarse, en la medida de lo posible, a la realidad biológica. El modelo conceptual propuesto, incorpora tres (3) microambientes a nivel de sistema inmune (microambiente-1: diferenciación, proliferación y apoptosis celular; microambiente-2: vías de señalización TLRs; microambiente-3: secreción y vías de señalización de citoquinas), los cuales interactúan entre sí, y adicionalmente interactúan con el ciclo de vida del HPV16 y posteriormente con el control de vacunas terapéuticas. A partir de este modelo conceptual, se construye el prototipo, el cual se describe en detalle en el presente documento, y con el cual se realizan las simulaciones de los experimentos previamente documentados.

HPV16-ALIFE, como modelo de vida artificial, representa las interacciones que surgen entre el ciclo de vida del HPV16, el sistema inmune innato y adaptativo, y el desafío que se propone a través del diseño de una vacuna terapéutica. Aunque las pruebas realizadas previamente proponen vacunas DC autólogas, el modelo permite proponer otros tipos de vacunas terapéuticas, tales como anti-PD1, y definir estados combinados de activación e inactivación de algunos componentes que hacen parte de las vías de señalización TLRs y de citoquinas.

La rigurosidad biológica que se pretende, tanto en la definición del modelo conceptual (figura 3.1, modelo representado en tres (3) niveles que interactúan entre sí, y éstos a su vez interactuando con el ciclo de vida del HPV16 y con vacunas), así como el prototipo funcional desarrollado (HPV16-ALIFE), se fundamentan en el contenido de los libros anexos, los cuales son parte integral del presente trabajo.

En cuanto al prototipo desarrollado, es importante hacer notar que la interfaz gráfica de usuario resulta ser insuficiente para desplegar la cantidad de datos disponibles en el modelo. El prototipo se desarrolló para una pantalla de veintiuna (21) pulgadas, y no fue posible desplegar todos los datos por falta de espacio en el área de visualización, pues una de las fortalezas de la información en este modelo se encuentra en observar la evolución en una sola vista. No obstante, esta falencia por ahora puede ser suplida ocultando monitores e incorporando los que resulten de interés para el usuario que realiza el experimento.

Las pruebas realizadas con el prototipo, en las que se simularon pacientes con la enfermedad que no recibieron vacuna, pacientes con la enfermedad que recibieron vacuna terapéutica sin adyuvante y pacientes con la enfermedad que recibieron vacuna terapéutica con adyuvante, permitieron mostrar tendencias afines como las reportadas en los estudios adelantados por Rainone y colegas (Rainone et al., 2016) y Wang y colegas (Wang H.L. et al., 2014), frente al comportamiento de IL-12; con el estudio realizado por Wu y colegas (Wu et al., 2014), frente a la tendencia reportada en los niveles de expresión de las proteínas E6 y E7, incremento en la población CTL e inmunidad protectora específica desencadenada contra las células de cáncer cervical; con el estudio de Chan L.S. y colegas (Chang L.S. et al., 2014), frente al comportamiento de un agonista TLR9; con el estudio de Wick y colegas (Wick et al., 2011), frente al comportamiento de un agonista TLR3 o un agonista TLR9; y con Lin CT y colegas (Lin CT. et al., 2007), frente al comportamiento de un adyuvante IL-2.

El alcance del presente trabajo no considera demostrar la efectividad de los tipos de vacunas terapéuticas utilizadas en los experimentos, sin embargo el modelo propuesto permite establecer la eficacia de cada una de las vacunas terapéuticas simuladas en HPV16-ALIFE, estableciendo el tipo de vacuna que a nivel grupal (sin diferenciar el número de dosis realmente aplicada), y a nivel individual, resultan ser más efectivas para el modelo, teniendo en cuenta las condiciones del microambiente simulado. Esto no implica que la vacuna mejor calificada resulte ser igualmente efectiva en el mundo real, pero dada la similitud que se observa en la tendencia que reporta la respuesta inmune del modelo simulado frente a ensayos del mundo real, podría sugerir un nuevo orden como guía de evaluación, al momento de planificar nuevos ensayos para ser aplicados en otros modelos (virtuales, animales y humanos). No obstante, sería necesario comprobarlo en el mundo real. Si bien el orden de eficacia que propone el modelo podría ser una guía, comprobarlo en el mundo real se encuentra fuera del alcance del presente trabajo.

Tal como sucede con el sistema inmune y con el ciclo de vida HPV16, este trabajo también ha sido complejo, si se considera que se ha partido de una condición básica de aprendizaje en el campo de la Biología, y se ha procurado generar un modelo con rigurosidad biológica, en su concepción como modelo de vida artificial.

No obstante lo anterior, hay claridad en que aún queda mucho trabajo pendiente para convertir este modelo en aquel, que apoyado en herramientas de vida artificial, pudiera obviar las pruebas en modelos animales y tener la certeza de su efectividad al incorporar vacunas terapéuticas en humanos, para mitigar los efectos que causa este virus al ser agente causal de varios tipos de cáncer. Sin embargo, el esfuerzo ha valido la pena, aunque el aporte que resulta sea pequeño ante la magnitud que el desafío representa.

6.2. TRABAJOS FUTUROS

La aplicación de vida artificial al estudio de vacunas para el control del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV16-ALIFE), tiene amplias posibilidades para incrementar su potencial funcional, dado que pueden ser incorporados aspectos adicionales sobre la base construida, para apoyar la investigación en casos más específicos, como los que se mencionan a continuación:

- Implementar controles adicionales que permitan evaluar el grado de toxicidad que pudiera estar asociado a diseños de vacunas que se prueben en el modelo. Actualmente, el modelo plantea la dosis que requiere para controlar la población de células cancerosas, pero no establece si la frecuencia y carga pueden resultar tóxicas para el ser humano.
- Incorporar al modelo la red completa de quimioquinas, considerando que el modelo actual solo hace uso de unas pocas, dado el sesgo por HPV16 y cáncer cervical.
- Incorporar parámetros adicionales que perfilen el desarrollo de vacunas personalizadas, es decir, involucrando características que definan de forma específica al huésped.
- Incorporar parámetros que permitan evaluar el impacto que podría tener, el utilizar diferentes vías (por ejemplo, intramuscular, oral, nasal, tópica, entre otras), al momento de suministrar las dosis de las vacunas en estudio.

El modelo también tiene potencial para estudiar otros tipos de cánceres que se originan en virus (por ejemplo, EBV, HBV, entre otros), y algunas enfermedades autoinmunes sistémicas (por ejemplo, artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, entre otras).

Para fortalecer el prototipo desarrollado, se hace conveniente incorporar un módulo estadístico que permita evaluar de forma integral los datos que el modelo reporta como resultado de las simulaciones que se realizan.

Considerando que tanto el sistema inmune como el ciclo de vida del HPV16, son campos activos de investigación, el prototipo debe incorporar los hallazgos que a futuro se confirmen, para garantizar su rigurosidad biológica, especialmente en temas donde los resultados clínicos actualmente reportan controversia.

Mientras esto ocurre, continuar trabajando y seguir investigando en procura de complementar y potenciar cada vez más el modelo propuesto.

GLOSARIO DE TERMINOS

A

- Ablación Genética:** Es un método de modificar el DNA, buscando interrumpir la producción de un gen específico. Los experimentos de ablación genética son usados para resolver problemas relacionados con linajes celulares y la función *in-vivo* de ciertos grupos de células (Chen Y-T, 2004).
- AC:** Acrónimo en español de Autómata Celular. Son sistemas dinámicos en términos de espacio, tiempo y valor. Un estado de un autómata celular es un arreglo espacial de células discretas, cada una conteniendo un valor seleccionado a partir de un alfabeto finito. El espacio de un autómata celular es el conjunto de tales configuraciones.
- AC Lineal:** Un autómata celular lineal es aquel para el cual una regla actualizada satisface la condición que su acción sobre la suma de dos estados de forma separada equivalen a la acción de la suma de dos estados más su acción sobre el estado en el cual todas las células contienen el símbolo quiescente.
- Adyuvante:** Agente mezclado con un antígeno que mejora la respuesta inmune de este antígeno en el proceso de inmunización (Pardoll, 2002).
- Anergia:** Describe un estado de usencia de respuesta de larga duración, parcial o total, inducida por activación parcial (Lechler et al., 2001).
- Angiogénesis:** Formación de vasos sanguíneos. La angiogénesis tumoral es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que el tumor necesita para crecer. Fuente: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?CdrID=46529>.
- Apoptosis:** La apoptosis es una forma de muerte celular que está regulada genéticamente. Es una serie de procesos moleculares en la célula que le conducen a la muerte. Es el proceso normal mediante el cual el cuerpo se deshace de células innecesarias o anormales. El proceso de apoptosis puede ser inhibido en células cancerosas. Cuando una célula muere por apoptosis, empaqueta su contenido citoplasmático, lo que evita que se produzca la respuesta inflamatoria característica de la muerte accidental o necrosis. En lugar de hincharse y reventar, las células en proceso de apoptosis y sus núcleos se encogen, y con frecuencia se fragmentan conformando vesículas pequeñas que contienen el material citoplasmático. También se le denomina muerte programada. Fuente: <http://www.cancer.gov/diccionario/?CdrID=46524>.
- Autofagia:** Proceso normal en el cual una célula destruye proteínas y otras sustancias en su citoplasma, lo cual puede conducir a la muerte celular. Fuente: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?CdrID=561319>.
- Avidez:** Suma total de la fuerza de la unión entre dos moléculas o células en uno o múltiples sitios (Lollini et al., 2006).

C

- CA:** Acrónimo en ingles de "Cellular Automata". Autómata Celular. (Ver AC).
- Cápside:** Es una estructura proteica formada por una serie de monómeros llamados capsómeros.
- Capsómero:** Cada una de las subunidades de proteína que constituyen la cápside. Su número y disposición son característicos de cada virus.
- Cis-presentación:** Cualquiera de una familia de proteínas que son inducidas por varias citoquinas y contienen un dominio SH2. Ellas se unen a receptores citoquinas y suprimen la señalización citoquina a través de proteínas STAT (Oxford, 2008).

D

- DAMP:** Son moléculas que pueden iniciar y perpetuar reacciones inmunes en la respuesta inflamatoria no infecciosa (*Damage-associated molecular patterns*). Son señales de peligro que conducen a que una respuesta inmune tenga lugar (Escamilla et al., 2013).
- Desfosforilar:** Alguna reacción en la cual grupos fosfatos son removidos químicamente o enzimáticamente (Oxford, 2008).
- Dimerizar:** Acción de formar un dímero (Oxford, 2008). Reacción química que une dos subunidades moleculares que resultan en la formación de dímero. Fuente: <http://www.biology-online.org/dictionary/Dimerization>.
-

E

- Episoma:** Elemento genético que algunas veces se encuentra en las células, especialmente aquellas de bacterias, y que pueden replicarse ya sea cuando se integra con o independientemente del cromosoma del huésped. Algún fragmento del DNA que existe en una célula como un elemento extra cromosomal (Oxford, 2008).
- Epitope:** Grupo determinante inmunológico de un antígeno (Oxford, 2008).
- Estructura de cristal:** Cristalografía. Estudio de formas geométricas de cristal. (Oxford, 2008).
- Expresión constitutiva:** En el contexto de genes, corresponde a genes que son expresados siguiendo interacciones entre un promotor y polimerasa RNA sin regulación adicional (Oxford, 2008).
-

F

- Factor de riesgo:** De acuerdo con NCI (*National Cancer Institute*), es algo que aumenta las posibilidades de desarrollar una enfermedad. Algunos ejemplos de factores de riesgo para el cáncer son la edad, antecedentes familiares de ciertos tipos de cáncer, el uso de los productos del tabaco, la exposición a la radiación o ciertas sustancias químicas, infección por determinados virus y bacterias, y ciertos cambios genéticos.
- Fosforilar:** Acto o proceso de introducir un grupo fosfórico, un anhídrido fosfórico, o un amino fosfórico. Reacciones de fosforilación bioquímica son importantes en la captación de energía, formación de biosíntesis intermedia durante procesos metabólicos, y en el control de numerosas enzimas y otras proteínas (Oxford, 2008).
-

H

- Homeóstasis:** Mantenimiento de un medio ambiente interno relativamente constante en los cuerpos de grandes animales por medio de una serie de interacciones fisiológicas y procesos bioquímicos (Oxford, 2008).
- Hipoxia:** Presencia de menos cantidad de la normal de dioxígeno en un vertebrado o en su sangre (Oxford, 2008).
- Homodimerización:** Proceso mediante el cual dos unidades idénticas son no-covalentemente asociadas, formando una estructura macromolecular (Oxford, 2008).
- Humoral:** La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra microbios extracelulares y sus toxinas, en el cual, los componentes del sistema inmune que atacan a los antígenos no son las células directamente sino los anticuerpos secretados por activación antigénica.
-
-

I

Idiotipo:	Porción de un receptor de célula-T o inmunoglobulina, definida por la región hipervariable e involucrada en el reconocimiento de antígeno, la cual es totalmente única (Pardoll, 2002).
Incidencia:	Número de nuevos casos registrados en un período determinado en una población específica. Se expresa como un número absoluto de casos por año o como una tasa por cada 100,000 personas por año. La incidencia proporciona una aproximación al riesgo promedio de desarrollar, cáncer de cuello uterino en este caso (Globocan 2008).
Infectividad:	Capacidad de un agente patógeno (bacteria, virus...) para invadir un organismo y provocar en él una infección. http://es.wikipedia.org/wiki/Infectividad .
Interactoma:	Nombre que recibe el mapa completo de interacciones de proteínas que pueden ocurrir en un organismo vivo (De las Rivas, 2010).

K

kDa:	Unidad de masa atómica. Equivale a una doceava parte de la masa del núcleo del isótopo más abundante del carbono: el carbono-12. Se corresponde aproximadamente con la masa de un protón (o un átomo de hidrógeno). Se abrevia como "uma", aunque también puede encontrarse por su acrónimo inglés: "amu" (Atomic Mass Unit).
-------------	---

L

Ligando:	Es un átomo, ión, molécula o grupo molecular que se une a otra entidad para formar un complejo mayor.
-----------------	---

M

Mitosis:	Proceso de reparto equitativo del material hereditario (DNA). El proceso completo produce células genéticamente idénticas y éste es el fundamento del crecimiento, de la reparación tisular y de la reproducción asexual.
Mortalidad:	Es el número de muertes que se produce en un período determinado en una población específica. Se expresa como un número absoluto de muertes al año o como una tasa por cada 100,000 personas por año (Globocan 2008).

O

Opsonización:	Término que se refiere a un proceso inmune donde las partículas tales como bacterias, son enfocadas para destrucción por una célula inmune conocida como fagocito. Sin este proceso, el reconocimiento y destrucción de agentes invasores tales como bacterias podría ser ineficiente. Fuente: http://www.encyclopedia.com/topic/Opsonization.aspx .
ORF:	Acrónimo en inglés de " <i>Open-reading frames</i> ". Marcos de lectura abierta. Es una secuencia que contiene un codón inicial y un codón final en el mismo marco. Se supone que el ORF es un gen que codifica una proteína pero en algunas proteínas codificadas para ORF no son conocidas.

P

- PAMP:** Moléculas asociadas con grupos de patógenos que son reconocidas por las células del sistema inmune innato. Estas moléculas son referidas como pequeños motivos conservados dentro de una clase de microbios. Son reconocidos por TLRs (*Toll-like receptors*) y PRRs (*pathogen recognition receptors*), tanto en plantas como en animales. Inician y perpetúan respuesta inflamatoria de patógenos infecciosos (Escamilla et al., 2013).
- Paratope:** Parte de un anticuerpo, formado por el ciclo hipervariable de regiones variables, que se unen a un epítipo (Oxford, 2008).
- Patogénesis:** Generación y producción, origen y desarrollo, de una enfermedad (Oxford, 2008).
- PRR:** Proteínas expresadas por las células del sistema inmune innato para identificar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales están asociados con patógenos microbianos o estrés celular, así como también patrones moleculares asociados a daño (DAMPs).
- Período de Latencia:** es el tiempo de retraso entre la exposición a un agente causante de la enfermedad y la aparición de la enfermedad. En enfermedades infecciosas, con frecuencia el período de latencia e incubación son iguales, pero esto no sucede siempre. Una enfermedad puede estar incubada, pero permanecer latente o inactiva dentro del cuerpo.
- Pleiotrópico:** Fenómeno en el cual un solo gen es responsable por la múltiple producción, distinta, aparentemente no relacionada de efectos fenotípicos (Oxford, 2008).
- Poliubiquitinación:** Forma en la cual la ubiquitina es sintetizada, un precursor con una cantidad de repeticiones de cabeza-a-cola (Oxford, 2008).
- Proteólisis:** Degradación de una proteína, usualmente por hidrólisis en una o más de sus uniones péptido (Oxford, 2008).
-

R

- Regla AC:** La regla, o regla actualizada de un autómata celular describe como algún estado dado es transformado a un estado sucesor. La actualización de reglas de un AC está descrita por una tabla de reglas, las cuales definen una posición local en el mapa del vecindario, y son equivalentes a una actualización del mapa global.
- Replicación:** Proceso por el que una molécula de DNA o ARN origina otra idéntica a la pre-existente. En general, duplicación del ácido nucleico.
Fuente: <http://ciencia.glosario.net/biotecnologia/replicaci%F3n-10179.html>.
- Riesgo acumulado:** La incidencia / mortalidad acumulada es la probabilidad o riesgo de las personas de adquirir o morir a causa de la enfermedad durante un período de tiempo específico. En cáncer, se expresa como el número de recién nacidos (de un total de 100 o 1000) que se espera desarrolle / muera de un cáncer en particular, antes de los 75 años de edad, si se mantuvieran las tasas de cáncer observadas en el período, en ausencia de las causas de competencia de la enfermedad (Globocan 2008).
-

S

- Senescencia:** Proceso de envejecer (Oxford, 2008). En el contexto celular, se refiere a la detención irreversible del proceso de proliferación (crecimiento) que ocurre cuando las células potencialmente experimentan estrés oncogénico.
-
-

Síntesis: Producción de una molécula más compleja a partir de reactivos más sencillos o por una serie de reacciones (Oxford, 2008).

T

- Tasa cruda:** Para un tumor específico y la población, la tasa cruda se calcula simple dividiendo el número de nuevos casos de cáncer o las muertes por cáncer (de cuello uterino en este caso), observadas durante un período de tiempo determinado por el correspondiente número años-personas en la población en riesgo. En cáncer, generalmente se expresa como una tasa anual por cada 100,000 personas en riesgo.
- Transactivar:** Describe el proceso de transferir un elemento genético regulador cuyos efectos son insensibles a su posición (Oxford, 2008). También se refiere a la tasa creciente de transcripción que puede ser estimulada por medios naturales o artificiales. Fuente: <http://www.biology-online.org/dictionary/Transactivation>.
- Translocar:** Proceso de transferencia vectorial. En el contexto genético, corresponde al intercambio de segmentos de cromosomas no-homólogos. Las translocaciones son aparentes cuando la cantidad de cromosomas es correcta, pero dos cromosomas tienen tamaños anormales y patrones de unión. Algunos están asociados con malignidad.
- Transcripción:** En el campo de la biología, es el proceso en el cual una célula elabora una copia de RNA de una secuencia del gen DNA. Fuente: <http://www.cancer.gov/diccionario/?CdrID=390290>.
- Transudación:** Cualquier fluídos que con sus solutos, ha pasado a través de una membrana o a través de los intersticios de un sistema (Oxford, 2008).
- TNM:** Sistema que clasifica los tumores de tres formas: T, según la extensión del tumor primario; N, según ausencia o presencia de un compromiso regional linfático de los ganglios; y M, según ausencia o presencia de metástasis a distancia. Determinado el TNM, se asigna un estadio que puede ser I, II, III o IV; I cuando la etapa es temprana y IV cuando la enfermedad está avanzada.
-

U

- Ubiquitina:** También denominada ubicuitina, es una pequeña proteína que aparece naturalmente en células eucariotas. Su principal función es la de marcar otras proteínas para su destrucción. Este proceso se conoce como proteólisis. Varias moléculas de ubiquitina se anclan a la proteína a eliminar y ésta se mueve hacia el proteosoma, una estructura con forma de barril donde se lleva a cabo el proceso de la proteólisis. La ubiquitina puede marcar incluso proteínas de la membrana de la célula, por ejemplo receptores, para que sean eliminadas de la membrana. Está formada por 76 aminoácidos y tiene una masa molecular de aproximadamente 8,6 kDa. Su estructura está sumamente conservada en el linaje eucariota. Las ubiquitinas del ser humano y de la levadura son idénticas en el 96 % (Solo 3 de los 76 residuos difieren entre la ubiquitina de levadura y la humana).
-

V

- Vecindario:** El vecindario de una célula determinada es el conjunto de células que contribuyen a la actualización de un valor en la célula bajo la regla de actualización especificada.
- Virión:** En medicina, microbiología y biología se denomina virión a la partícula vírica morfológicamente completa e infecciosa. Está compuesto por: (a) Ácido nucléico vírico: Puede ser DNA o RNA, solo una de ellos, de cadena doble o sencilla; (b) Proteínas víricas: Forman la cubierta externa o cápside, compuesta por subunidades que se denominan "capsómeros", son proteínas estructurales, pero el virión puede tener también proteínas
-

enzimáticas y aglutinantes; (c) La nucleo-cápside (es decir, la cápside más el genoma (RNA o DNA)) puede tener distintas formas. En algunos casos (virus con envoltura) el virión contiene también una membrana lipídica que envuelve a la nucleocápside y contiene proteínas de origen viral y algunas proteínas de la célula infectada. Ejemplos de virus con envoltura son el VIH (contiene las glicoproteínas gp120 y gp41 virales y algunas moléculas celulares) o el virus de la gripe (contiene la neuroaminidasa y la hemaglutinina virales).

Virulencia: Capacidad de un microorganismo o virus para causar enfermedad en un huésped bajo ciertas condiciones (Oxford, 2008).

Virus: Un virus (del latín virus, "toxina" o "veneno") es un agente infeccioso sub-microscópico que es incapaz de crecer o reproducirse por mismo y requiere estar dentro de una célula huésped. Los virus infectan todos los tipos de vida celular. Se compone de dos o tres partes: todos los virus tienen genes hechos o bien de DNA o de RNA, moléculas largas portadoras de información genética, y todos tienen una capa proteínica que protege a estos genes (Membrana), y algunos tienen una envoltura de grasa que los rodea cuando no se encuentran dentro de una célula (Cápside). Los virus varían en forma, desde una forma helicoidal o icosaedral hasta estructuras más complejas.

REFERENCIAS

- Abou-Jaoudé, W., Monteiro, P.T., Naldi, A., Grandclaoudon, M., Soumelis, V., Chaouiya, C., Thieffry, D. 2015. Model checking to assess T-helper cell plasticity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2(86):1-13. doi: 10.3389/fbioe.2014.00086.
- Aguilar, W., Santamaría-Bonfil, G., Froese, T., Gershenson, C. 2014. The past, present, and future for artificial life. *Frontiers in Robotics and AI*, 1:8. doi:10.3389/frobt.2014.00008.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., and Akdis, C.A. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, Functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3):701-721.e1-70. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.050.
- Alaa, G., Fitzgerald, G. 2013. Re-conceptualizing agile information systems development using complex adaptive systems theory. *E:CO*, 15(3):1-23.
- Alarcon, T., Byrne, H.M., Maini, P.K. 2006. A multiple scale model for tumor growth. *Society for Industrial and Applied Mathematics. Multiscale Model and Simulation*, 3(2):440-475. doi:10.1137/040603760.
- Alber MS, Kiskowski MA, Glazier JA, Jiang Y. 2003. On Cellular Automaton Approaches to Modeling Biological Cells. In: Rosenthal J, Gilliam DS (eds) *Mathematical Systems Theory in Biology, Communication, and Finance*, IMA Volume. Springer, New York, pp 1-39.
- Ali, N.I.M., Malek, M.A., Ismail, A.R. 2015. Immune network algorithm in monthly streamflow prediction at johor river. *ARP Journal of Engineering and Applied Sciences*, 10(3):1352-1356.
- Álvarez-Errico, D., Vento-Torm, R., Sieweke, m., Ballestar, E. 2015. Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function. *Nature Reviews Immunology*, 15(1): 7-17. doi:10.1038/nri3777.
- Amador-Molina, A., Hernández-Valencia, J.F., Lamoyi, E., Contreras-Paredes, A., Lizano, M. 2013. Rol of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. *Viruses*, 5:2624-2642. doi:10.3390/v5112624.
- American Association for Clinical Chemistry. Lab Test Online. 2015. Consulta 5 de octubre de 2015 en: <https://labtestsonline.org/understanding/analytes/blood-smear/details/start/1>.
- American Cancer Society. 2012. Cancer Prevention & Early Detection Facts & Figures. Atlanta, GA. Accessed 24 June 2012 at: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-033423.pdf>.
- American Cancer Society, 2012a. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society. Accessed 23 June 2012 at: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>.
- American Cancer Society. 2015. Cancer prevention and early detection facts and figures 2015-2016. Atlanta: American Cancer Society.
- American Cancer Society. 2015a. Cancer Immunotherapy. Consulta 28 de diciembre de 2015 en: www.cancer.gov.
- An, G., Mi, Q., Dutta-Moscato, J., Vodovotz, Y. 2009. Agent-based models in translational systems biology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and medicine*, 1(2):159-171. doi:10.1002/wsbm.45.
- Arazi, A., Pendegraft, W.F. 3rd, Ribeiro, R.M., Perelson, A.S., Hachohen, N. 2013. Human systems immunology: hypothesis-based modeling and unbiased data-driven approaches. *Seminars in Immunology*, 25(3):193-200. doi:10.1016/j.smim.2012.11.003.
- Baird, L., Fagin, B. 2012. Conserved energy functions for cellular automata: finding nontrivials faster through a complete theory of the trivials. *Journal Of Cellular Automata*. 7(2):115-150.
- Baldazzi, V., Castiglione, F., Bernaschi, M. 2006. An enhanced agent based model of the immune system response. *Cellular Immunology*, 244 (2):77-79. doi:10.1016/j.cellimm.2006.12.006.
- Bandini, S., Mauri, G., Vizzari, G. 2006. Supporting action-at-a-distance in situated Cellular Agents. *Fundamenta Informaticae*. 69(3):251-271.
- Bardi, J.S. 2012. New NIAID program aims to model immune responses and key infectious diseases. Accessed 8 September 2012 at: <http://www.nih.gov/news/pr/jul2006/niaid-12.htm>.
- Barrón, E.V., Roman-Bassare, E., Sánchez-Sandoval, A.L., Espinosa, A.M., Guardado-Estrada, M., Medina, I., Juárez, E., Alfaro, A., Bermúdez, M., Zamora, R., García-Ruiz, C., Gomora, J.C., Kofman, S., Pérez-Armendariz, E.M., Berumen, J. 2015. CDKN3 mRNA as a biomarker for survival and therapeutic target in cervical cancer. *PLoS ONE*, 10(9):e0137397. doi:10.1371/journal.pone.0137397.
- Basu, R., O'Quinn, D.B., Silberger D.J., Schoeb, T.R., Fouser, L., Wuyang, W., Hatton, R.D., Weaver, C.T. 2012. Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria. *Immunity*, 37(6):1061-1075. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.024.
- Basu, R., Hatton, R.D., Weaver, C.T. 2013. The Th17 family: flexibility follows function. *Immunological Reviews*, 252(1):89-103. doi:10.1111/imr.12035.
- Bataglia, M., Roncarolo, M.G. 2009. The fate of human Treg cells. *Immunity*, 30(6):763-765. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.006.

- Bauer, A.L., Beauchemin, C.A.A., Perelson, A.S. 2009. Agent-based modeling of host-pathogen systems: the successes and challenges. *Information Sciences*, 179(10):1379-1389. doi:10.1016/j.ins.2008.11.012.
- Beauchemin, C., Forrest, S., Koster, F.T., 2006. Modeling influenza viral dynamics in tissue, in: H. Bersin and J. Carneiro (Eds.), *Proceedings of the Fifth International Conference on Artificial Immune Systems (ICARIS 06)*, Lecture Notes in Computer Science, vol. 4163, Springer-Verlag, Berlin, 2006, pp. 23-36.
- Beauchemin, C. 2012. MASyV: A Multi-Agent System Visualization package. Free open-source GNU GPL software available online on SourceForge.net at: <http://masyv.sourceforge.net/> [Accessed 9 September 2012].
- Bermúdez-Morales, V.H., Gutiérrez, L.X., Alcocer-González, J.M., Burguete, A., Madrid-Marina, V. 2008. Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape. *Cancer Investigation*, 26:1073-1043. doi: 10.1080/07357900802112693.
- Bermúdez-Morales, V.H., Peralta-Zaragoza, O., Alcocer-González, J.M., Moreno, J., Madrid-Marina, V. 2011. IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 4:369-375. doi:10.3892/mmr.2011.429.
- Bernaschi, M., Castiglione, F. 2001. Design and implementation of an immune system simulator. *Computers in Biology and Medicine*, 31(5):303-331. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0010-4825(01)00011-7.
- Berry, J.M., Palefsky, J.M. 2003. A review of human papillomavirus vaccines: from basic science to clinical trials. *Frontiers of Bioscience*, 8:s333-345.
- Bezzi, M., Celada, F., Ruffo, S., Seiden, P.E. 1997. The transition between immune and disease states in a cellular automaton model of clonal immune response. *Physica A*, 245 (1-2):145-163.
- Bhat, P., Mattarollo, S.R., Gosmann, C., Frazer, I.H., Leggatt, G.R. 2011. Regulation of immune responses to HPV Infection and during HPV-directed immunotherapy. *Immunological Reviews*, 239:85-98. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00966.x.
- Bionumbers. The database of useful biological number. 2015. Accessed 4 de octubre de 2015 at: <http://bionumbers.hms.harvard.edu/bionumber.aspx?s=n&id=111788&ver=3>.
- Biron, C.A., Nguyen K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17:189-220. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.189.
- Bolpetti, A., Silva, J.S., Villa, L.L., Lepique, A.P. 2010. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunology*, 11:27. doi:10.1186/1471-2172-11-27.
- Bonjardim, C.A. 2005. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses- and viruses counteract IFN action. *Microbes and Infection*, 7(3):569-578. doi:10.1016/j.micinf.2005.02.001.
- Bortnick, A., Allman, A. 2013. What is and what should always have been: long-lived plasma cells induced by T cell-independent antigens. *The Journal of Immunology*, 190:5913-5918. doi:10.4049/jimmunol.1300161.
- Bourke, C.D., Prendergast, C.T., Sanin, D.E., Oulton, T.E., Hall, R.J., Mountford, A.P. 2015. Epidermal keratinocytes initiate wound healing and pro-inflammatory immune responses following percutaneous schistosome infection. *International Journal for Parasitology*, 45(4):215-224. doi:10.1016/j.ijpara.2014.11.002.
- Brassard, D.L., Grace, M.J., Bordens, R.W. 2002. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *Journal of Leukocyte Biology*, 71(4):565-581.
- Bremer, E. 2013. Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. *ISRN Oncology*, Article ID 371854, 25 pages. doi:10.1155/2013/371854.
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Alberto, G., Aldea M., Serrano, B., Valencia, S., Brotons, M., Mena, N., Cosano, R., Muñoz, J., Bosch, F.X., de San José, S., Castellsagué, X. 2015. ICO Information Centre on HOV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 2015-12-23.
- Burnet, F.M. 1959. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Cambridge at the University Press. 209 pages. Vanderbilt University Press, Nashville, Tennessee, USA. Available in: <https://archive.org/stream/clonalselectiont00burn#page/n11/mode/2up>.
- Castiglione, F., Duca, K., Jarrah, A., Laubenbacher, R., Hochberg, D., Thorley-Lawson, D. 2007. Simulating epstein-barr virus infection with C-ImmSim. *Bioinformatics*, 23(11):1371-1377. doi: 10.1093/bioinformatics/btm044.
- Castiglione, F., Bernaschi, M. 2011. Epitope screening and cell cooperation in the immune response. *Intelligent Systems, Modelling and Simulations (ISMS)*, 2011 Second International Conference, pp. 127-132. doi: 10.1109/ISMS.2011.30.
- Celada, F., Seiden, P.E. 1996. Affinity maturation and hypermutation in a simulation of the humoral immune response. *European Journal of Immunology*, 26(6):1350-1358. doi:10.1002/eji.1830260626.
- Celada, F., Seiden, P.E. 1998. Modeling immune cognition, in: 1998 IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics, 11-14 October, San Diego, CA, vol. 4, 1998, pp. 3787-3792.
- Chan, C.J., Smyth, M.J., Martinet, L. 2014. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death and Differentiation*, 21(1):5-14. doi:10.1038/cdd.2013.26.
- Chang, J.T., palanivel, V.R., Kinjo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J.S., Russell, S.M., Wininger, W., Reiner, S.L. 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315(5819):1687-1691. doi:10.1126/science.1139393.

- Chang, L.S., Leng, C.H., Yeh, Y.C., Wu, C.C., Chen, H.W., Huang, H.M., Liu, S.J. 2014. Toll-like receptor 9 agonist enhances anti-tumor immunity and inhibits tumor-associated immunosuppressive cells numbers in a mouse cervical cancer model following recombinant lipoprotein therapy. *Molecular Cancer*, 13:60. doi:10.1186/1476-4598-13-60.
- Chen, M., Huang, L., Wang, J. 2013. Analyses of programmed cell death in dendritic cells. *Methods in Molecular Biology*, 979:51-63. doi:10.1007/978-1-62703-290-2_6.
- Cheung, D, Pérez-Delgado, C.A. 2010. Cellular automata as a model of physical systems. *Journal Of Cellular Automata*. 5(6):469-480.
- Clifford, G.M., Rana, R.K., Franceschi, S., Smith, J.S., Gough, G., Pimenta, J.M. 2005. Human Papillomavirus Genotype Distribution in Low-Grade Cervical Lesions: Comparison by Geographical Region and with Cervical Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 14(5):1157–1164. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0812.
- Conesa-Zamora, P. 2013. Immune responses against virus and tumor in cervical carcinogenesis: treatment strategies for avoiding the HPV-induced immune escape. *Gynecologic Oncology*, 131:480-488. doi:10.1016/j.ygyno.2013.08.025.
- Crotty, S. 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity Review*, 41:529-542. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.004.
- Dasari, S., Wudayagiri, R., Valluru, L. 2015. Cervical cancer: biomarkers for diagnostic and treatment. *Clinica Chimica Acta*, 445:7-11. doi: 10.1016/j.cca.2015.03.005.
- Daudi, J. 2015. An overview of application of artificial immune system in swarm robotic systems. *Advances in Robotics and Automation*, 4:1. doi:10.4172/2168-9695.1000127.
- De Castro, L. N., Von Zuben, F. J. 2002. Learning and Optimization Using the Clonal Selection Principle. *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, Special Issue on Artificial Immune Systems (IEEE), 6(3):239–251. doi:10.1109/TEVC.2002.1011539.
- De Oliveira, L.M.F., Morale, M.G., Chaves, A.A.M., Cavalher, A.M., Lopes, A.S., Diniz, M.d.O., Schanoski, A.S., de Melo, R.L., Ferrerira, L.C.dS, de Oliveira, M.L.S., Demasi, M., Ho, P.L. 2015. Design, immune responses and anti-tumor potential of an HPV16 E6E7 multi-epitope vaccine. *PLoS ONE*, 10(9): e0138686. doi:10.1371/journal.pone.0138686
- De Silva, N.S., Klein, U. 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. *Natural Reviews Immunology*, 15: 137-148. doi:10.1038/nri3804.
- Degli-Esposti, M.A., Smyth, M.J. 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Reviews Immunology*, 5(2):112-124. doi:10.1038/nri1549.
- Deligeoroglou, E., Giannouli, A., Athanasopoulos, N., Karountzos, V., Vatopoulou, A., Dimopoulos, K., Creatsas, G. 2013. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, Volume 2013, Article ID 540850, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/540850>.
- Deng, S., Zhu, S., Qiao, Y., Liu, Y.J., Chen, W., Zhao, G., Chen, J. 2014. Protein and Cell, 5(12):899-911. doi:10.1007/s13238-014-0112-6.
- Deshpande, A., Nolan, J.P., White, S., Valdez, Y., Hunt, W.C., Peuton, C.L., Wheeler, C.M. 2005. TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(6):969-976. doi:10.1086/427826.
- Dibra, D., Cutrera, J., Xia, X., Kallakury, B., Mishra, L., Li, S., 2012. Interleukin-30: a novel antiinflammatory cytokine candidate for prevention and treatment of inflammatory cytokine-induced liver injury. *Hepatology*, 55 (4): 1204–1214. doi:10.1002/hep.24814.
- Dixit, S., Singh, G., Chandel, G.S. 2011. Optimizing Mining Association Rules for Artificial Immune System based Classification. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 3(8):6732-6738.
- Donnelly, R.P., Kotenko, S.V., 2010. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 30(8):555–564. doi:10.1089/jir.2010.0078.
- Dunne, E.F., Unger E.R., Sternberg, M., McQuillan, G., Swan, D.C., Patel, S.S., Markowitz, L.E. 2007. Prevalence of HPV Infection Among Females in United States. *The Journal of the American Medical Association*, 297(8):813-819. doi:10.1001/jama.297.8.813.
- Ebeling, W., Schweitzer, F. 2001. Swarms of particle agents with harmonic interactions. *Theory in Biosciences*, 120(3-4):207–224. doi:10.1007/s12064-001-0019-7.
- Affymetrix-eBioscience. 2015. Cytokines-Atlas. Headquarters San Diego, CA 92121.USA. Accessed 20 November 2015 at: <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/cytokines.htm>.
- Ellis, B., Herbert, S.I. Complex adaptive systems (CAS): an overview of key elements, characteristics and application to management theory. *Informatics in Primary Care*, 19(1):33-37.
- Ermentrout, G.B., Edelstein-Keshet, L. 1993. Cellular Automata Approaches to Biological Modeling. *Journal of Theoretical Biology*, 160(1):97-133. doi:10.1006/jtbi.1993.1007.
- Escobar-Ospina, M.E., Gómez, J. 2010. Modelo de crecimiento de las variantes del virus de papiloma humano tipo 16. Tesis Maestría. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Escobar, M.E., 2010. Technical Report Alife_001: Caracterización biológica del virus del papiloma humano tipo 16. Maestría Ingeniería de Sistemas y Computación. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería de Sistemas e Industrial. Accessed 2 April 2012 at: <http://www.disi.unal.edu.co/grupos/alife/papers/>.
- Escobar-Ospina, M.E., Gómez-Perdomo, J. 2013. A growth model of human papillomavirus type 16 designed from cellular automata and agent-based models. *Artificial Intelligence in Medicine*, 57(1):31-47. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.artmed.2012.11.001>.

- Fausch, S.C., Da Silva, D.M., Eiben, G.L., Poole, C.L., Kast, W.M. 2003. HPV protein/peptide vaccines: from animal model to clinical trials. *Frontiers in Bioscience*, 8:s81-91.
- Fernandes, A.P.M., Goncalves, M.A.G., Duarte, G., Cunha, F.Q., Simoes, R.T., Donadi, E.A. 2005. HPV16, HPV18, and HIV infection may be influence cervical cytokine intralesional levels. *Virology*, 334:294-298. doi:10.1016/j.virol.2005.01.029.
- Filippova, M., Brown-Bryan, T.A., Casiano, C.A., Duerksen-Hughes, P.J. 2005. The human papillomavirus 16 E6 protein can either protect or further sensitize cells to TNF: effect of dose. *Cell Death and Differentiation*, 12:1662-1635. doi:10.1038/sj.cdd.4401678.
- Forrest, S., Perelson, A.S., Allen, L., Cherukuri, R. 1994. Self-nonself discrimination in a computer. *Proceedings of the IEEE Symposium on Research in Security and Privacy, IEEE Computer Society Symposium on Press*, pp.202-212. 16-18 May 1994. 10.1109/RISP.1994.296580.
- Freedberg, I.M., Tomic-Canic, M., Komine, M., Blumenberg, M. 2001. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *The Journal of Investigative Dermatology*, 116(5): 633-640.
- Froese, T., Virgo, N., Ikegami, T. 2015. Motility at the origin of life: its characterization and model. *Artificial Life*, 20:55-76. doi:10.1162/ARTL_a_00096.
- Furtado, B.A., Sakowski, P.A.M., Tóvoli, M.H. Ed. 2015. *Modeling complex systems for public policies*. Institute for Applied Economic Research, Brasilia. ISBN: 978-85-7811-249-3.
- Gao, Y., Kazama, H., Yonejara, S. 2012. Bim regulates B-cell receptor-mediated apoptosis in the presence of CD40 signaling in CD40-pre-activated splenic B cells differentiating into plasma cells. *International Immunology*, 24(5):283-292. doi:10.1093/intimm/dxr127.
- Garçon, N., Morel, S., Didierlaurent, A., Descamps, D., Wettendorff, M., Van Mechelen, M. 2011. Development of an AS04-Adjuvanted HPV Vaccine with the Adjuvant System Approach. *Biodrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals And Gene Therapy*. [serial online]. 25(4):217-226. doi:10.2165/11591760-000000000-00000.
- Garret, S.M. 2005. How do evaluate artificial immune system. *Evolutionary Computation*, 13(2):145-177. doi:10.1162/1063656054088512.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M., Merad, M., Ley, K. 2010. Development of Monocytes, macrophages and Dendritic cells. *Science*, 327(5966):656-661. doi:10.1126/science.1178331.
- Gemignani, F., Landi, S., Chabier, A., Smet, A., Zehbe, I., Canzian, F., Tommasino, M. 2004. Generation of a DNA microarray for determination of E6 natural variants of human papillomavirus type 16. *Journal of Virological Methods*. 119(2):95-102. doi:10.1016/j.jviromet.2004.02.018.
- Genest, B., Kuske, D., Muscholl, A. 2007. On communicating automata with bounded channels. *Fundamenta Informaticae*, 80(1-3):147-167.
- Globocan, 2008. International Agency for Research on cancer. Accessed 23 June 2012 at: <http://globocan.iarc.fr/>.
- Globocan, 2012. International Agency for Research on cancer. Globocan 2012: estimates cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012. Accessed 23 December 2015 at: http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx.
- Gunawardena, J. 2010. Biological Systems Theory. *Sciences*, 328(5978):581-582. doi:10.1126/science.1188974.
- Guo, P., Wang, J., Liu, J., Xia, M., Li, W. 2015. Macrophage immigration inhibitory factor promotes cell proliferation and inhibits apoptosis of cervical adenocarcinoma. *Tumor Biology*, 36:5095-5102. doi:10.1007/s13277-015-3161-4.
- Haensler, J., Probeck, P., Si, J., Piras, F., Dalencon, F., Cotte, JF., Chambon, V., Iqbal, S.M., Hawkins, L., Burdin, N. 2015. Design and preclinical characterization of a novel vaccine adjuvant formulation consisting of a synthetic TLR4 agonist in a thermoreversible squalene emulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 486(1-2):99-111. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.03.028.
- Halloran, M.E., Longini Jr., I.M., Struchiner, C.J. 2010. *Design and analysis of vaccine studies*. Springer New York. ISSN 1431-8776. doi:10.1007/978-0-387-68636-3.
- Han, K.T., Sin, JI. 2013. DNA vaccines targeting human papillomavirus-associated diseases: progresses in animal and clinical studies. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2(2):106-114. doi:10.7774/cevr.2013.2.2.106.
- Harper, D.M., Vierthaler, S.L., Santee, J.A. 2010. Review of Gardasil. *Journal of Vaccines and Vaccination*, 1(3):1-7. doi:10.4172/2157-7560.1000107.
- Hawkins, E.D., Turner, M.L., Dowling, M.R., Gend, C., Hodking, P.D. 2007. A model of immune regulation as a consequence of randomized lymphocyte division and death times. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12):5032-5037. doi:10.1073/pnas.0700026104.
- Hawkins, E.D., Markham, J.F., McGuiness, L.P., Hodking, P.D., Nossal, G.J. 2009. A single-cell pedigree analysis of alternative stochastic lymphocyte fates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32):13457-13462. doi:10.1073/pnas.0905629106.
- Heesters, B.A., Myers, R.C., Carroll, M.C. 2014. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nature Reviews Immunology*, 14:495-504. doi:10.1038/nri3689.
- Helbing, D., Baretto, S. How to do agent-based simulations in the future: from modeling social mechanism to emergent phenomena and interactive systems design. Chapter 2: agent-based modeling of the book *Social Self-Organization*. Springer, Berlin, pp. 25-70. doi:10.1007/978-3-642-24004-1 2.

- Hennacy, K. 2005. Wolfram's new science: a new start?. Book review, *Artificial Intelligence*, 169(2):150-164. doi:10.1016/j.artint.2005.10.013.
- Hirsch, I., Caux, C., Hasan, U., Bndriss-Vermare, N., Olive, D. 2010. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. *Trends in Immunology*, 31(10):391-397. doi:10.1016/j.it.2010.07.004.
- Hoffmann, G.W. 2011. *Immune Network Theory*, Second edition. ISBN 978-0-9812196-0-8. Printed by Still Creek Press, Burnaby, Canada.
- Hoffmann, HH., Schneider, W.M., Rice, C.M. 2015. Interferons and viruses. And evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends in Immunology*, 36(3):124-138. doi.org/10.1016/j.it.2015.01.004.
- Hwang, M., Garbey, M., Berceli, S.A., Tran-S.T., R. 2009. Rule-based simulation of multi-cellular biological systems – a review of modeling techniques. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2(3):285-294. doi:10.1007/s12195-009-0078-2.
- InvivoGen. 2015. TLR and NLR signaling pathways. Headquarters San Diego, CA 92121.USA. Accessed 20 November 2015 at: <http://www.invivogen.com/docs/TLR-NLR-signaling.pdf>.
- Isaza-Correa, J.M., Liang, Z., Van-der-Berg, A., Diepstra, A., Visser, L. 2014. Toll-like receptors in the pathogenesis of human B cell malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*, 7:57. doi:10.1186/s13045-014-0057-5.
- Ito, H., Seishima, M. 2010. Regulation of the induction and function of cytotoxic T lymphocytes by natural killer T cell. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 641757, 8 pages. doi:10.1155/2010/641757.
- Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T. 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14:36-49. doi:10.1038/nri3581.
- Jenkins, M.R., Griffiths, G.M. 2010. The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. *Current Opinion in Immunology*, 22(3):308-313. doi:10.1016/j.coi.2010.02.008.
- Jin, L., Sturgis, E.M., Zhang, Y., Huang, Z., Song, X., Li, C., Wei, Q., Li, G. 2013. Association of tumor necrosis factor- α promoter variants with risk of HPV-associated oral squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, 12:80. doi:10.1186/1476-4598-12-80.
- Jinushi, M., Yagita, H., Yoshiyama, H., Tahara, H. 2013. Putting the brakes on anticancer therapies: suppression of innate immune pathways by tumor-associated myeloid cells. *Trends in Molecular Medicine*, 19(9):536-545. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.06.001
- Jones, D., McWilliam, R., Purvis, A. 2011. Convergence and feedback: a framework for bounded cellular automata design. *Journal of Cellular Automata*, 6(4/5):399-416.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., Ahmed, R. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 2(4):251-262. doi:10.1038/nri778.
- Kaech, S.M., Cui, W. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 12:749-761. doi:10.1038/nri3307.
- Kannan, Y., Wilson, M.S. 2012. TEC and MAPK kinase signalling pathways in T helper (Th) cell development, Th2 differentiation and allergic asthma. *Journal of Clinical and Cellular Immunology*, S12:011. doi:10.4172/2155-9899.S12-011.
- Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., Xu, Y., Frohlich, M.W., Schellhammer, P.F. 2010. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363(5):411-422. doi:10.1056/NEJMoa1001294.
- Kanzler H., Barrat FJ, HesselM, Coffman RL. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonist and antagonist. *Nature Medicine*, 13(5): 552-559. doi:10.1038/nm1589.
- Karim, R., Tummers, B., Meyer, C., Biryukov, J.L., Alam, S., Banckendorf, C., Jha, V., Offringa, R., van Ommen, G.J.B., Melief, C.J.M., Guardavaccaro, D., Boer, J.M., van der Burg, S.H. 2013. Human Papillomavirus (HPV) Upregulates the Cellular Deubiquitinase UCHL1 to Suppress the Keratinocyte's Innate Immune Response. *Plos Pathogens*, 9(5):e1003384. doi:10.1371/journal.ppat.1003384
- Kasama, T., Ohtsuka, K., Sato, M., Takahashi, R., Wakabayashi, K., Kobayashi, K. 2010. Macrophage migration inhibitory factor: a multifunctional cytokine in rheumatic diseases. *Arthritis*, Article ID 106202, 10 pages. doi: 10.1155/2010/106202.
- Katz, J.S. 2015. What is a complex innovation system?. SPRU Working Paper Series 2015-21, SPRU –Sciences and Technology Policy Research, University of Sussex, Falmer, Brighton, UK.
- Kaufmann, S.A. 1993. *The origins of order: self-organization and selection in evolution*. Oxford University Press, 709 pages. USA. ISBN 978-0195079517.
- Kawai, T., Akira, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5):373–384. doi:10.1038/ni.1863.
- Kelly, B., O'Neill, L.A.J., 2015. Metabolic reprogramming in macrophages and Dendritic cells in innate immunity. *Cell Research*, 25(7):771-784. doi:10.1038/cr.2015.68.
- Khan, M.T., de Silva, C.W. 2008. Autonomous fault tolerance multi-robot cooperation using artificial immune system. *Automation and Logistics. ICAL 2008. IEEE International Conference on 2008*. Pages: 623-628. doi:10.1109/ICAL.2008.4636225.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1):1–14. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.

- Klasen, C., Ohl, K., Sternkopf, M., Shachar, I., Schmitz, C., Heussen, N., Hobeika, E., Levit-Zerdoun, E., Tenbrock, K., Reth, M., Bernhagen, J., Bounkari, O.E. 2014. MIR promotes B cell chemotaxis through the receptors CXCR4 and CD74 and ZAP-70 signaling. *The Journal of Immunology*, 192:5273-5284. doi: 10.4049/jimmunol.1302209.
- Kleinstein, S.H., Seiden, P.E. 2000. Simulating the immune system. *Computer in Science & Engineering*, 2(4):69-77.
- Kohaar, I., Thakur, N., Salhan, S., Batra, S., Singh, V., Sharma, A., Sodhani, P., Das, B.C., Sarkar, D.P., Bharadwaj, M. 2007. TNF α -308G/A polymorphism as a risk factor for HPV associated cervical cancer in Indian population. *Cellular Oncology*, 29(3):249-256. doi: 10.1155/2007/418247.
- Kohler, b., Puzone, R., Seiden, P.E., Celada, F. 2001. A systematic approach to vaccine complexity using an automaton model of the cellular and humoral immune system. I. Viral characteristics and polarized responses. *Vaccine*, 19(7-8):862-876. doi:10.1016/S0264-410X(00)00225-5.
- Kols, A., Sherris, J. 2000. HPV Vaccines: Promise and Challenges. Seattle, WA: Program for Applied Technology in Health (PATH), 2000.
- Kopp, E., Medzhitov, R. 2003. Recognition of microbial by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 15(4):396-401. doi:10.1016/S0952-7915(03)00080-3
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., Zitvogel, L. 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *The Annual Review of Immunology*, 31:51-72. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100008.
- Kurosaki, T., Shinohara, H., Baba, Y. 2010. B cell signalling and fate decision. *Annual Review of Immunology*, 28:21-55. Doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132541.
- Kurosaki, T., Kometani, K., Ise, W. 2015. Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3):149-159. doi:10.1038/nri3802.
- Kushwah, R., Hu, J. 2010. Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity. *The Journal of Immunology*, 185(2):795-802. doi:10.4049/jimmunol.1000325.
- Kushwah, R., Hu, J. 2011. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology*, 133(4):409-419. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03457.x.
- Lace, M.J., Anson, J.R., Haugen, T.H., Dierdoff, J.M., Turek, L.P. 2015. Interferon treatment of human keratinocytes extrachromosomal, persistent HPV16 plasmid genomes induces de novo viral integration. *Carcinogenesis*, 36(1):151-159. doi:10.1093/carcin/bgu236.
- Laddha, N.C., Dwivedi, M., Gani, A.R., Mansuri, M.S., Begum, R. 2013. Tumor necrosis factor B (TNFB) genetic variants and its increased expression are associated with vitiligo susceptibility. *PLoS ONE*, 8(11):e81736. doi:10.1371/journal.pone.0081736.
- Langman, R.E., Mata, J., Cohn, M. 2003. A computerized model for the self-non-self discrimination at the level of the Th (Th genesis). II. The behavior of the system upon encounter with non-self antigens. *International Immunology*, 15(5):593-609.
- Langton, C.G. 1989. Artificial Life. In: Langton CG (ed). *Artificial Life: The Proceedings of an Interdisciplinary Workshop on the Synthesis and Simulation of Living Systems*. Los Alamos, Sept 1987, Santa Fe Institute Studies in the Sciences of Complexity, vol VI. Addison-Wesley.
- Lazarenko, L.M., Nikitina, O.E., Nikitin, E.V., Demchenko, O.M., Kovtonyuk, G.V., Ganova, L.O., Bubnov, R.V., Shevchuk, V.O., Nastradina, N.M., Bila, V.V., Spivak, M.Y. 2014. Development of biomarker panel to predict, prevent and create treatments tailored to the persons with human papillomavirus-induced cervical precancerous lesions. *The European Association for Predictive, Preventive and Personalized Medicine Journal*, 5(1):1-20. doi: 10.1186/1878-5085-5-1.
- Lebrec, H., Ponce, R., Preston, B.D., Iles, J., Born, t.L., Hooper, M. 2015. Tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk. *Current Medical Research and Opinion*, 31(3):557-574. doi:10.1185/03007995.2015.1011778.
- Lee, S., Kim, J.H., Kim, H., Kang, J.W., Kim, S.H., Yang, Y., Kim, J., Park, J., Park, S., Hong, J., Yoon, D.Y. 2010. Activation of the interleukin-32 pro-inflammatory pathway in response to human papillomavirus infection and over-expression of interleukin-32 controls the expression of the human papillomavirus oncogene. *Immunology*, 132:410-420. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03377.x.
- Lee, S.M.Y., Kok, K.H., Jaume, M., Cheung, T.K.W., Yip, T.F., Lai, J.C.C., Guan, Y., Webster, R., Jin, D.Y., Peiris, J.S.M. 2014. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 111(10):3793-3798. doi:10.1073/pnas.1324266111.
- Leonard, W.J., Spolski, R. 2005. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 5:688-698. doi:10.1038/nri1688.
- Lim, K.H., Staudt, L.M. 2013. Toll-Like Receptor Signaling. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, 5:a011247. doi:10.1101/cshperspect.a011247.
- Lin, C.T., Tsai, T.C., He, L., Yeh, C.N., Chang, T.C., Soong, Y.K., Monie, A., Hung, C.F., Lai, C.H. 2007. DNA vaccines encoding IL-2 linked antigen generate enhanced E7-specific CTL responses and antitumor activity. *Immunology Letters*, 114(2):86-93. doi:10.1016/j.imlet.2007.09.008.
- Lin, C.W., Hsueh, Y.P. 2014. Sarm1, a neuronal inflammatory regulator, controls social interaction, associative memory and cognitive flexibility in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37:142-151. doi:10.1016/j.bbi.2013.12.002.
- Lin, C.W., Chen, C.Y., Cheng, S.J., Hu, H.T., Hsueh, Y.P. 2014. Sarm1 deficiency impairs synaptic function and leads to behavioral deficits, which can be ameliorated by an mGluR allosteric modulator. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol. 8, article 87. doi:10.3389/fncel.2014.00087.
- Lin, F.C., Young, H.A. 2014. Interferons: success in anti-viral immunotherapy. *Cytokines & Growth Factor Reviews*, 25:369-376. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.015.

- Linch, S.N., Kasiewicz, M.J., McNamara, M.J., Hilgart-Martiszus, I.F., Farhad, M., Redmond, W.L. 2016. Combination OX40 agonism/CTLA-4 blockade with Her2 vaccination reverses T-cell anergy and promotes survival in tumor-bearing mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(3):E319-E327. doi: 10.1073/pnas.1510518113.
- Lippitz, B. 2013. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncology*, 14:e218-228. doi:10.1016/S1470-2045(12)70582-X.
- Liston, A., Gray, D.H.D. 2014. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nature Reviews Immunology*, 14(3):154-165. doi:10.1038/nri3605.
- Lollini, P.-L., Cavallo, F., Nanni, P., Forni, G. 2006. Vaccines for tumour prevention. *Nature Reviews Cancer*, 6(3):204-216. doi:10.1038/nrc1815.
- Loscalzo, J., Barabasi, A.L. 2011. Systems biology and the future of medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 3(6):619-627. doi:10.1002/wsbm.144.
- Lowy, D.R., Schiller, J.T. 1998. Papillomaviruses and cervical cancer: pathogenesis and vaccine development. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 23:27-30.
- Lutz, C.T., Karapetyan, A., Al-Attar, A., Shelton, B.J., Holt, K.J., Tucker, J.H., Presnell, S.R. 2011. Human natural killer cells proliferate and die in vivo more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults. *The Journal of Immunology*, 186(8):4590-4598. doi:10.4049/jimmunol.1002732.
- Luke, D.A., Stamatakis, K.A. 2012. Systems science methods in public health. *Annual Review of Public Health*, 33:357-376. doi:10.1146/annurev-publhealth-031210-101222.
- Macal, C.M., North, M.J. 2006. Tutorial on agent-based modeling and simulation part 2: how to model with agents, *Simulation Conference 2006, WSC 06. Proceedings of the 2006 Winter Simulation Conference. IEEE*. pp.73-83.
- Mace, E.M., Dongre, P., Hsu, H.T., Sinha, P., James, A.M., Mann, S.S., Forbes, L.R., Watkin, L.B., Orange, J.S. 2014. Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunology and Cell Biology*, 92:245-255. doi:10.1038/icb.2013.96.
- Maeda, K., Sakama, C. 2007. Identifying cellular automata rules. *Journal of Cellular Automata*. 2:1-20.
- Maier, E., Werner, D., Duschl, A., Bohle, B., Horejs-Hoeck, J. 2014. Human Th2 but not Th9 cells release IL-31 in a stat6/nf-kb-dependent way. *The Journal of Immunology*, 193:645-654. doi:10.4049/jimmunol.1301836.
- Manz, R.A., Radbruch, A. 2002. Plasma cells for a lifetime. *European Journal of Immunology*, 32(4):923-927.
- Martínez, F.O., Gordon, S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F100Prime Reports*, 6, 13. doi:10.12703/P6-13.
- Martínez-García, M., Hernández-Lemus, E. 2013. Health systems as complex systems. *American Journal of Operations Research*, 3(1A):113-126. doi:10.4236/ajor.2013.31A011.
- Martínez-Sánchez, M.E., Mendoza, L., Villareal, C., Alvarez-Buylla, E.R. 2015. A minimal regulatory network of extrinsic and intrinsic factors recovers observed patterns of CD4+ T cell differentiation and plasticity. *Plos Computational Biology*, 11(6): 1-23. doi:10.1371/journal.pcbi.1004324.
- Mata, J., Cohn, M. 2007. Cellular automata-based modeling program: synthetic immune system. *Immunological Reviews*. 216(1):198-212. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00511.x.
- McCormack, P.L., Joura, E.A. 2011. Spotlight on quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil (R)) in the prevention of premalignant genital lesions, genital cancer, and genital warts in women. *Biodrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy [serial online]*, 25(5):339-343.
- McKeage, K., Romanowski, B. 2011. Spotlight on AS04-Adjuvanted Human Papillomavirus (HPV) Types 16 and 18 Vaccine (Cervarix). *Biodrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy [serial online]*. 25(4):265-269.
- Meier-Schellersheim, M., Mack, G. 1999. SIMMUNE, a tool for simulating and analyzing immune system behavior. [online] Available at: <http://arxiv.org/pdf/cs/9903017.pdf> [Accessed 8 September 2012].
- Melchers, F. 2015. Checkpoints that control B cell development. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(6):2203-2210. doi:10.1172/JCI78083.
- Melief, C.J.M. 2013. "License to Kill" reflects joint action of CD4 and CD8 Tcells. *Clinical Cancer Research*, 19(16):4295-4296. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1432.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., von-Andrian, U.H. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, 427: 154-159. doi:10.1038/nature02238.
- Mente, C., Prade, I., Brusch, L., Breier, G., Deutsch, A. 2011. Parameter estimation with a novel gradient-based optimization method for biological lattice-gas cellular automaton models. *Journal of Mathematical Biology*, 63(1):173-200. doi:10.1007/s00285-010-0366-4.
- Merad, M., Manz, M.G. 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 113(15):3418-3427. doi:10.1182/blood-2008-12-180646
- Merelli, E., Rucco, M., Sloat, P., Tesei, L. 2015. Topological characterization of complex systems: using persistent entropy. *Entropy*, 17(10):6872-6892. doi:10.3390/e17106872.
- Meyers, R.A. Ed., 2009. *Encyclopedia of Complexity and Systems Science*. SpringerScience+BusinessMedia, LLC., 233 Spring Street, New York. Pp. 92-271.

- Mitchell, M., Newman, M. 2002. Complex systems theory and evolution. Encyclopedia of Evolution (M.Pagel, editor), New York: Oxford University Press.
- Microsoft, Research. 2012. Computational Modelling of Immune System Processes. Accessed 8 September 2012 at: <http://research.microsoft.com/en-us/projects/immunology/>.
- Mills, K.H.G. 2011. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nature Review Immunology*, 11: 807-822. doi:10.1038/nri3095.
- Misra, J. 1986. Distributed discrete-event simulation. *ACM Computer Surveys*, 18(1):39-65.
- Mitleton-Kelly, Eve, ed. (2003). Complex systems and evolutionary perspectives on organisations: the applications of complexity theory to organisations. Advances series in management. Elsevier Science Ltd, oxford, UK. ISBN 9780080439570.
- Montoya, D., Inkeles, M., Liu, P., Realegeno, S., Teles, R.M.B., Vaidya, P., Munoz, M.A., Schenk, M., Swindell, W.R., Chun, R., Zavala, K., Hewison, M., Adams, J.S., Horvath, S., Pellegrini, M., Bloom, B.R., Modlin, R.L. 2014. IL-32 is a molecular marker of a host defense network in human tuberculosis. *Science Translational Medicine*, 6(250): 250ra114. doi:10.1126/scitranslmed.3009546.
- Motta, S., Castiglione, F., Lollini, P., Pappalardo. 2005. Modelling vaccination schedules for a cancer immunoprevention vaccine. *Immunome Research*, 1(1):5. doi:10.1186/1745-7580-1-5.
- Mueller, J. Free Software Foundation, Inc. 2015. Accessed 20 January 2015 at: <http://freemind.sourceforge.net>. Boston, MA. USA.
- Muto, V., Stellacci, E., Lamberti, A.G., Perrotti, E., Carrabba, A., Matera, G., Sgarbanti, M., Battistini, A., Liberto, M.C., Focà, A. 2011. Human papillomavirus type 16 E5 protein induces expression of beta interferon through interferon regulatory factor 1 in human keratinocytes. *Journal of Virology*, 85(10):5070-5080. doi:10.1128/JVI.02114-10.
- Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y, O'Shea, J. 2012. Helper T cell diversity and plasticity. *Current Opinion in Immunology*, 24(3):297-302. doi:10.1016/j.coi.2012.01.014.
- National Cancer Institute. 2011. Cancer Vaccines. US Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. FactSheet. Accessed 23 June 2012 at: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/cancer-vaccines>.
- National Cancer Institute. 2011a. Human Papillomavirus (HPV) Vaccines. US Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. FactSheet. Accessed 23 June 2012 at: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Prevention/HPV-vaccine>.
- National Cancer Institute. 2012. Defining Cancer. US Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. Accessed 23 June 2012 at: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>.
- National Cancer Institute. 2015. NCI Dictionary of Cancer Terms. NCI Shady Grove Campus, Rockville, MD 20850, USA. Accessed 15 December 2015 at: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45618>.
- Neuzille, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., de Gramont, A. 2015. Targeting the TGFβ pathway for cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 147:22-31.
- Neves, F., Abrantes, J., Almeida, T., de Matos, A.L., Costa, P.P., Esteves, P.J. 2015. Genetic characterization of interleukins (IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12A, IL-12B, IL-15 and IL-18) with relevant biological roles in lagomorphs. *Innate Immunity*, 21(8):787-801. doi:10.1177/1753425915606209.
- Newton, K., Dixit, V.M. 2012. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4:a006049. doi:10.1101/cshperspect.a006049.
- Niebler, M., Qian, X., Höfler, D., Kogosov, V., Kaewprag, J., Kaufmann, A.M., Ly, R., Böhmer, G., Zawatzky, R., Rösl, F., Rincon-Orozco, B. 2013. Post-Translational Control of IL-1b via the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein: A Novel Mechanism of Innate Immune Escape Mediated by the E3-Ubiquitin Ligase E6-AP and p53. *PLoS Pathogens*, 9(8): e1003536. doi:10.1371/journal.ppat.1003536.
- Nigam, D., Kumar, V. 2012. Artificial immune system: a potential tool to handle bioinformatics issues. *International of Artificial Intelligence and Knowledge Discovery*, 2(1):1-5.
- Nussbaum, A.K., Whitton, J.L. 2004. The contraction phase of virus-specific CD8+ T cells is unaffected by a pan-caspase inhibitor. *The Journal of Immunology*, 173(11):6611-6618. doi:10.4049/jimmunol.173.11.6611.
- Nutt, S.L., Hodking, P.D., Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M. 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*, 15:160-171. doi:10.1038/nri3795.
- O'Malley, M.A., Brigandt, I., Love, A.C., Crawford, J.W., Gilbert, J.A., Knight, R., Mitchell, S.D., Rohwer, F. 2014. Multilevel research strategies and biological systems. *Philosophy of Sciences*, 81(5):811-828. doi:10.1086/677889.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., Bowie, A.G. 2013. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(6):453-460. doi:10.1038/nri3446.
- Organización Mundial de la Salud. 2012. Estadísticas sanitarias mundiales 2012. Accessed 27 July 2012 at: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/es/index.html.
- Onomza, W.V., Alhassan, J., Alelere, M., Tunde, A. 2015. Development of secure plus antivirus with the artificial immune system model. *International Journal of Innovative Technology and Research*, 3(2):1882-1896.
- Öztürkeri, C., Johnson, C.G. 2011. Evolution of self-assembling patterns in cellular automata using development. *Journal of Cellular Automata*. 6(4/5):257-300.

- Palmius, J., Persson-Slumpi, T. 2010. A comparison of three approaches to model human behavior. *American Institute of Physics, Conference Proceeding*, 1303(1):354-362.
- Pang, C.L., Thierry, F. 2013. Human papillomavirus protein as prospective therapeutic targets. *Microbial Pathogenesis*, 58:55-65. doi:10.1016/j.micpath.2012.11.002.
- Pappalardo, F., Lollini, P.L., Castiglione, F., Motta, S. 2005. Modeling and simulation of cancer immunoprevention vaccine. *Bioinformatics*, 21(12):2891-2897. doi:10.1186/1745-7580-1-5.
- Pappalardo, F., Pennisi, M., Castiglione, F., Motta, S. 2010. Vaccine protocols optimization: In silico experiences. *Biotechnology Advances*, 28(1):82-93. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.10.001.
- Pappalardo, F., Forero, I.M., Pennisi, M., Palazon, A., Melero, I., Motta, S. 2011. SimB16: Modeling Induced Immune System Response against B16-Melanoma. *PLoS ONE*, 6(10):e26523. doi:10.1371/journal.pone.0026523.
- Paradkar, P.H., Joshi, J.V., Mertia, P-N., Agashe, S.V., Vaidya, R.A. 2014. Role of cytokines in genesis, progression and prognosis of cervical cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(9):3851-3864. doi:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.9.3851.
- Parhi, J., Sahoo, L., Choudhury, J., Choudhury, T.G., Baruah, A., PaniPrasad, K., Makesh, M. 2015. Molecular characterization and expression analysis of interferon γ (IFN- γ) gene in label rohita (ham). *Aquaculture Reports*, 2:97-105. doi:10.1016/j.aqrep.2015.08.007.
- Park, J.S., Kim, E.J., Kwon, H.J., Hwang, E.S., Namkoong, S.E., Um, S.J. 2000. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein: Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (10): 6764-6769. doi: 10.1074/jbc.275.10.6764.
- Park, C.S., Yoon, S.O., Armitage, R.J., Choi, Y.S. 2004. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *The Journal of Immunology*, 173:6676-6683. doi: 10.4049/jimmunol.173.11.6676.
- Pathak, S.D., Day, J.M., Mair, A., Sawaya, W.J., Kristal, M.M. 2007. Complexity and adaptivity in supply networks: building supply networks theory using a complex adaptive systems perspective. *Decision Sciences*, 38(4):547-580. doi:10.1111/j.1540-5915.2007.00170.x
- Paul, W.E., Kishimoto, T., Melchers, F., Metcalf, D., Mosmann, T., Oppenheim, J., Ruddle, N., Belgium, V.S. WHO-IUIS Nomenclature Subcommittee on Interleukin Designation. 1992. Nomenclatura for secreted regulatory proteins of the immune system (interleukins). *Clinical & Experimental Immunology*, 88: 367-367. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb03089.x.
- Pearce, E.J., Everts, B. 2015. Dendritic cell metabolism. *Nature Reviews Immunology*, 15:18-29. doi:10.1038/nri3771.
- Pedoeem, A., Azoulay-Alfaguter, I., Strazza, M., Silverman, G.J., Mor, A. 2014. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clinical Immunology*, 153(1):145-152. doi:10.1016/j.clim.2014.04.010.
- Pennisi, M., Catanuto, R., Pappalardo, F., Motta, S. 2008. Optimal vaccination schedules using simulated annealing. *Bioinformatics*, 24(15):1740-1742. doi:10.1093/bioinformatics/btn260.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., Kedl, R.M. 2013. T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Advances in Physiology Education*, 37(4):273-283. doi:10.1152/advan.00066.2013.
- Perales-Linares, R., Navas-Martin, S. 2013. Toll-like receptor 3 in viral pathogenesis: friend or foe?. *Immunology*, 140: 153-167. doi:10.1111/imm.12143.
- Pickup, M., Novitskiy, S., Moses, H.L. 2013. The roles of TGF- β in the tumour microenvironment. *Nature reviews cancer*, 13:788-799. doi:10.1038/nrc3603.
- Pierson, W., Cauwe, B., Policheni, A., Schiener, S.M., Franckaert, D., Berges, J., Humblet-Baron, S., Chonefeldt, S., Herold, M.J., Hildeman, D., Strasser, A., Bouillet, P., Lu, L.F., Mattys, P., Freitas, A.A., Luther, R.J., Weaver, C.T., Dooley, J., Gray, D.H.D., Liston, A. 2013. Anti-apoptotic Mcl-1 is critical for the survival and niche-filling capacity of foxp3+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 14(9):959-965. doi:10.1038/ni.2649.
- Probert, L. 2015. TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, 3023:2-22. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.038.
- Qiagen. 2015. Pathway Central. Hildem, Germany. Consulta 28 de noviembre de 2015 en: <https://www.qiagen.com/es/shop/genes-and-pathways/pathway-central/>.
- Qian, H. 2013. Stochastic physics, complex systems and biology. *Quantitative Biology*, 1(1):50-53. doi:10.1007/s40484-013-0002-6.
- R&D Systems, Inc. 2015. Interactive pathways and processes. Minneapolis, MN 5541.USA. Consulta 29 de noviembre de 2015 en: <https://www.rndsystems.com/>.
- Rai, N., Singh, A. Improved clonal selection algorithm (ICLONALG). *International Journal of Current Engineering and Technology*, 5(4):2459-2464.
- Rainone, V., Martelli, C., Ottobriani, L., Biasin, M., Borelli, M., Lucignani, G., Trabattoni, D., Clerici, M. 2016. Immunological characterization of whole tumour lysate-loaded Dendritic cells for cancer Immunotherapy. *PLoS ONE*, 11(1):e0146622. doi:10.1371/journal.pone.0146622.
- Raj, D., Brash, D.E., Grossman, D. 2006. Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(2):243-257. doi:10.1038/sj.jid.5700008.
- Ray, T.S. 1994. An evolutionary approach to synthetic biology: zen and the art of creating life. *Artificial Life*, 1(1/2):195-226. MIT Press.

- Read, S.A., Douglas, M.W. 2014. Virus induced inflammation and cancer development. *Cancer Letters*, 345:174-181. doi:10.1016/j.canlet.2013.07.030.
- Reinholz, M., Kawakami, Y., Salzer, S., Kreuter, A., Dombrowski, Y., Koglin, S., Kresse, S., Ruzicka, T., Shauber, J. 2013. HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 305(8):723-732. doi:10.1007/s00403-013-1375-0.
- Ren, C., Cheng, X., Lu, B., Yang, G. 2013. Activation of interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 by human papillomavirus early proteins 6 induces fibroblast senescence to promote cervical tumorigenesis through autocrine and paracrine pathways in tumour microenvironment. *European Journal of Cancer*, 49(18):3889-3899. doi:10.1016/j.ejca.2013.07.140.
- Rezk, S.A., Nathwani, B.N., Zhao, X., Weiss, L.M. 2013. Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. *Human pathology*, 44(6):937-950. doi:10.1016/j.humpath.2012.10.005.
- Rietman, E.A., Karp, R.L., Tuszynski, J.A. 2011. Review and application of group theory to molecular systems biology. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 8:21. doi:10.1186/1742-4682-8-21.
- Romee, R., Leong, J.W., Fehniger, T.A. 2014. Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer. *Scientifica*, Article ID 205796, 18 pages. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2014/205796.
- Ronco, L.V., Karpova, A.Y., Vidal, M., Howley, P.M. 1998. Human Papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to Interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes and Development*, 12:2061-2072. doi:10.1101/gad.12.13.2061.
- Rosa, M.I., Morales, M.V., Vuolo, F., Petronilho, F., Bozzetti, M.C., Medeiros, L.R., Igansi, C.N., Silva, F.R., Dal-Pizzol, F., Rosa, D.D. 2012. Association of interleukin-6 in women with persistence of DNA-HPV: a nested case-control study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285:143-148. doi:10.1007/s00404-011-1925-7.
- Ross, J., Arkin, A.P. 2009. Complex systems: from chemistry to systems biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(16):6433-6434. doi:10.1073/pnas.0903406106.
- Sage, P.T., Sharpe, A.H. 2015. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends in Immunology*, 36(7):410-418. doi:10.1016/j.it.2015.05.005.
- Sakaguchi, S., Vignali, D.A.A., Rudensky, A.Y., Nieuwehuis, R.E., Waldman, H. 2013. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*, 13: 461-467. doi:10.1038/nri3464.
- Sanofi Pasteur Laboratory. 2012. Artificial Immune System to Further Vaccine Development. Accessed 7 September 2012 at: <http://www.healthmap.org/news/artificial-immune-system-further-vaccine-development>.
- Santé, I., García, A.M., Miranda, D., Crecente, R. 2010. Cellular automata models for the simulation of real-world urban processes: a review and analysis. *Landscape and Urban Planning*, 96(2):108-122. doi:10.1016/j.landurbplan.2010.03.001.
- Saybani, M.R., Shamshirband, S., Hormozi, S.G., Wah, T.Y., Aghabozorgi, S., Pourhoseingholi, M.A., Olariu, T. 2015. Diagnosing tuberculosis with a novel support vector machine-based artificial immune system recognition system. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 17(4):e24557. doi:10.5812/ircmj.17(4)2015.24557.
- Schwartzentruber, D.J., Lawson, D.H., Richards, J.M., Conry, R.M., Miller, D.M., Treisman, J., et al. 2011. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 364:2119-27. doi:10.1056/NEJMoa1012863.
- Scott, M.E., Shvetsov, Y.B., Thompson, P.J., Hernandez, B.Y., Zhu, X., Wilkens, L.R., Killeen, J., Vo, D.D., Moscicki, A.B., Goodman, M.T. 2013. Cervical cytokines and clearance of incident human papillomavirus infection: Hawaii HPV cohort study. *International Journal of Cancer*, 133(5):1187-1196. doi:10.1002/ijc.28119.
- Segovia-Juarez, J.L., Ganguli, S., Kirschner, D. 2004. Identifying control mechanisms of granuloma formation during *M. tuberculosis* infection using an agent-based model. *Journal of Theoretical Biology*, 231(3):357-376. doi:10.1016/j.jtbi.2004.06.031.
- Senovilla, L., Vacchelli, E., Garcia, P., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L. 2013. DNA vaccines for cancer therapy. *OncoImmunology*, 2:4, e23803. doi:http://dx.doi.org/10.4161/onci.23803.
- Shaikh, P.Z. 2011. Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 2(11):1247-1263.
- Shapiro, M., Duca, K.A., Lee, K., Delgado-Eckert, E., Hawkins, J., Jarrah, A.S., Laubenbacher, R., Polys, N.F., Hadinoto, V., Thorley-Lawson, D.A. 2008. A virtual look at Epstein-Barr virus infection: simulation mechanism. *Journal of Theoretical Biology*, 252(4):633-648. doi:10.1016/j.jtbi.2008.01.032.
- Shiau, M.Y., Fan, L.C., Yang, S.C., Tsao, C.H., Lee, H., Cheng, Y.W., Lai, L.C., Chang, Y.H. 2013. Human Papillomavirus Up-Regulates MMP-2 and MMP-9 Expression and Activity by Inducing Interleukin-8 in Lung Adenocarcinomas. *PLoS ONE* 8(1): e54423. doi:10.1371/journal.pone.0054423.
- Sim, G.C., Radvanyi, L. 2014. The IL-2 Cytokine Family in Cancer Immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25(4):377-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.018>.
- Sim, G.C., Martin-Orozco, N., Jin, L., Yang, Y., Wu, S., Washington, E., Sanders, D., Lacey, C., Wang, Y., Vence, L., Hwu, P., Radvanyi, L. 2014. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients. *The Journal of clinical investigation*, 124:99-110. doi:10.1172/JCI46266.

- Soares, K.C., Rucki, A.A., Wu, A.A., Olino, K., Xiao, Q., Chai, Y., Wamwea, A., et al. 2015. PD-1/PD-L1 blockade together with vaccine therapy facilitates effector T cell infiltration into pancreatic tumors. *Journal of Immunotherapy*, 38(1):1-11. doi:10.1097/CJI.0000000000000062.
- Song, S.H., Lee, J.K., Seok, O.S., Saw, H.S. 2007. The relationship between cytokines and HPV-16, HPV-16 E6, E7, and high-risk HPV viral load in the uterine cervix. *Gynecologic Oncology*, 104 (3): 732-738. doi:10.1016/j.ygyno.2006.10.054.
- Song, D., Li, H., Li, H., & Dai, J. 2015. Effect of human papillomavirus infection on the immune system and its role in the course of cervical cancer (Review). *Oncology Letters*, 10, 600-606. doi:10.3892/ol.2015.3295.
- Stanley, M. 2006. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, 24(1):S16-S22. doi:10.1016/j.vaccine.2005.09.002
- Stanley, M. 2008. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecologic Oncology*, 109(2 Suppl):s15-s21. doi:10.1016/j.ygyno.2008.02.003.
- Stanley, M. 2010. HPV – immune response to infection and vaccination. *Infectious Agents and Cancer*, 5:19. doi:10.1186/1750-9378-5-19.
- Stanley, M., Pinto, L.A., Trimble, C. 2012. Human papillomavirus vaccines – immune responses. *Vaccine*, 30S5:F83-F87. doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.106.
- Stemcell Technologies. 2015. Frequencies of cell types in human peripheral blood. Accessed 4 October 2015 at: <http://www.dartmouth.edu/~dartlab/uploads/CellTypes%20StemCell.pdf>.
- Stern, P.L., van der Burg, S.H., Hampson, I.N., Broker, T.R., Fiander, A., Lacey, C.J., Kitchener, H.C., Einstein, M.H. 2012. Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine*, 30S(5):F71-F82. doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.091.
- Stern, P.L., Einstein, M.H. 2012. Chapter 3 The immunobiology of human papillomavirus associated oncogenesis. In: Borruto, F., De Ridder, M. (eds). *HPV and cervical cancer*, pp. 45-61. Springer Science+Business Media, LLC. doi:10.1007/978-1-4614-1988-4_3.
- Stewart, J.J., Agosto, H., Litwin, S., Welsh, J.D., Shlomchik, M., Weigert, M., Seiden, P.E. 1997. A solution to the rheumatoid factor paradox: Pathologic rheumatoid factors can be tolerized by competition with natural rheumatoid factors. *The Journal of Immunology*, 159(4):1728-1738.
- Strain, M.C., Richman, D.D., Wong, J.K., Levine, H. 2002. Spatiotemporal dynamics of HIV propagation. *Journal of Theoretical Biology*, 218(1):85-96. doi:10.1006/jtbi.2002.3055.
- Su, H., Wu, A., Scotney, E. Ma, B., Monie, A., Hung, C.F., Wu, T.C.. 2010. Immunotherapy for cervical cancer. *Biodrugs*, 24(2):109-129. doi:10.2165/11532810-000000000-00000.
- Sun, J.C., Beilke, J.N., Bezman, N.A., Lanier, L.L. 2011. Homeostatic proliferation generates long-lived natural killer cells that respond against viral infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(2):357-368. doi:10.1084/jem.20100479.
- Tabata, C., Shibata, E., Tabata, R., Kanemura, S., Mikami, K., Nogi, Y., Masachika, E., Nishizaki, T., Nalano, T. 2013. Serum HMGB1 as a prognostic marker for malignant pleural mesothelioma. *Biomed Central Cancer*, 13: 205. doi:10.1186/1471-2407-13-205.
- Tangye, S.G., Avery, D.T., Deenick, E.K., Hodgkin, P.D. 2003. Intrinsic differences in the proliferation of naïve and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *The Journal of Immunology*, 170(2):686-694. doi:10.4049/jimmunol.170.2.686.
- Tarakanov, A., Dasgupta, D. 2000. A formal model of an artificial immune system. *Biosystem*, 55(1-3):151-158. doi:10.1016/S0303-2647(99)00093-3.
- Tarlington, D. 2012. B-cell differentiation: Instructive one day, stochastic the next. *Current Biology*, 22(7):R235-R237. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.045.
- Terabe, M., Robertson, F.C., Kato, S., De Ravin, E., Mirza, A., Berzofsky, J.A. 2014. Effects on tumor immunity of anti-TG-beta with different isoform specificities. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2(Suppl 3):62. doi:10.1186/2051-1426-2-S3-P62.
- Thaunat, O., Granja, A.G., Barral, P., Filby, A., Montaner, B., Collinson, L., Martinez-Martin, N., Harwood, N.E., Bruckbauer, A., Batista, F.D. 2012. Asymmetric segregation of polarized antigen on B cell division shapes presentation capacity. *Science*, 335(6067):475-479. doi:10.1126/science.1214100.
- Thomas-T, A., Hunter, C.A. 2003. Infection and cancer: The common vein. *Cytokine and Growth –Factor Reviews*, 14(1): 67-77. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00071-0.
- Thompson, M.R., Kaminski, J.J., Kirt-Jones, E.A., Fitzgerald, K.A. 2011. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*, 3(6):920-940. doi:10.3390/v3060920.
- Timmis, J., Hone, A., Stibor, T., Clark, E. 2008. Theoretical advances in artificial immune systems. *Theoretical Computer Science*, 403(1):11-32. doi:10.1016/j.tcs.2008.02.011.
- Torres-Poveda, K., Bahena-Román, M., Madrid-González, C., Burguete-García, A.I., Bermúdez-Morales, V.H., Peralta-Zaragoza, O., Madrid-Marina, V. 2014. Role of IL-10 and TGF-β1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(4):753-763. doi:10.5306/wjco.v5.i4.753
- Tummers, B., Van Der Burg, S.H. 2015. High-risk human papillomavirus target crossroads in immune signalling. *Viruses*, 7:2485-2506. doi:10.3390/v7052485.
- Tyring, S.K. 2000. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(1Pt.2):S18-S26. doi:10.1067/mjd.2000.107807.

- Uniprot.org. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43: D204-D212 (2015). Accessed 5 January 2015 at: <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=tlr+&sort=score>.
- Van Lier, R.A.W., ten Berge, I.J.M., Gamadia, L.E. 2003. Human CD8+ T-cell differentiation in response to viruses. *Nature Reviews Immunology*, 3:931-939. doi:10.1038/nri1254.
- Van Poelgeest, M.I.E., Welters, M.J.P., van Esch, E.M.G., Stynenbosch, L.F.M., Kerpershoek, G., van Meerten, E.L.vP., van den Hende, M., Löwik, M.J.G., et al. 2013. HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial. *Journal of Translational Medicine*, 11:88. doi:10.1186/1479-5876-11-88.
- Van't Veer, C., van den Pangaart, P.S., van Zoelen, M.A.D., de Kruijf, M., Birjmohun, R.S., Stroes, E.S., de Vos, A.F., van der Poll, T. 2007. Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *The Journal of Immunology*, 179(10):7110-7120. doi:10.4049/jimmunol.179.10.7110.
- Vigne, S., Palmer, G., Martin, P., Lamacchia, C., Strebel, D., Rodriguez, E., Ollerios, M.L., Vesin, D., Garcia, I., Ronchi, F., Sallusto, F., Sims, J.E., Gabay, C. 2012. IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4+ T cells. *Blood*, 120(17):3478-3487. doi:10.1182/blood-2012-06-439026.
- Voit, E.O. (Ed). 2012. *A first course in systems Biology. Chapter 1: Biological Systems.* 496 pages. ISBN: 9780815344674
- Wang, W., Zhang, P., Tan, Y., He, X. 2009. A Hierarchical Artificial Immune Model for Virus Detection, *Computational Intelligence and Security*, 2009. CIS '09. International Conference on, 1:1-5, 11-14 Dec. 2009. doi:10.1109/CIS.2009.57.
- Wang, H.L., Xu, H., Lu, W.H., Zhu, L., Yu, Y.H., Hong, F.Z. 2014. In vitro and in vivo evaluations of human papillomavirus type 16 (HPV16)-derived peptide-loaded dendritic cells (DCs) with a CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) adjuvant as tumor vaccines for immunotherapy of cervical cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289 (1): 155-162. doi:10.1007/s00404-013-2938-1.
- Warrender, C., Forrest, S., Koster, F. 2006. Modeling intercellular interactions in early Mycobacterium infection. *Bulletin of Mathematical Biology*, 68 (8):2233-2261. doi:10.1007/s11538-006-9103-y.
- Weck, P.K., Brandsma, J.L., Whisnant, J.K. 1986. Interferons in the treatment of human papillomavirus diseases. *Cancer and Metastasis Reviews*, 5: 139-165.
- Wells, A., Gudmundsdottir, H., Turka, L.A. 1997. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *Journal of Clinical Investigation*. 100(12):3173-3183. doi:10.1172/JCI119873.
- Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, J., Startk, G.R., Cao, Z. 1999. IRAK-M is a novel member of the pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(27):19403-19410. doi:10.1074/jbc.274.27.19403.
- Whiteside, T.L., Herberman, R.B. 1990. The biology of human natural killer cells. *Anali dell'Istituto Superiore I Sanità*, 26(3-4):335-348.
- Whiteside, T.L. 2010. Inhibiting the inhibitors: evaluating agents targeting cancer immunosuppression. *Expert Opinion on biological therapy*, 10(7):1019-1035. doi:10.1517/14712598.2010.48220.
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in World. Summary Report 2010. [online] Available at: www.who.int/hpvcentre [Accessed 22 June 2012].
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in World. Summary Report 2010. [online] Available at: www.who.int/hpvcentre [Accessed 22 June 2012].
- World Health Organization. 2014. *Weekly epidemiological record*, 43(89):465-492. ISSN 0049-8114
- Wiah, E.N., Dontwi, I.K., Adetunde, I.A. 2011. Using Mathematical Model to Depict the Immune Response to Hepatitis B Virus Infection. *Journal of Mathematics Research*, 3(2):157-167. doi:http://dx.doi.org/10.5539/jmr.v3n2p157.
- Wick, D.A., Webb, J.R. 2011. A novel, broad spectrum therapeutic HPV vaccine targeting the E7 proteins of HPV16, 18, 31, 45 and 52 that elicits potent E7-specific CD8T cell immunity and regression of large, established, E7-expressing TC-1 tumors. *Vaccine*, 29(44):7857-7866. doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.090.
- Wilensky, U. 1999. NetLogo. <http://ccl.northwestern.edu/netlogo/>. Center for Connected Learning and Computer-Based Modeling, Northwestern University, Evanston, IL.
- Wolfram, S. 1985. *Complex Systems Theory*. In *Emerging Syntheses in Sciences: proceedings of the Founding Workshops of the Santa Fe Institute* [Pines, D. (Ed.)] Santa Fe Institute, 261-266.
- Wu, X.M., Liu, X., Jiao, Q.F., Fu, S.Y., Bu, Y.Q., Song, F.Z., Yi, F.P. 2014. Cytotoxic T Lymphocytes elicited by dendritic cell-targeted delivery of human papillomavirus Type-16 E6/E7 fusion gene exert lethal effects on CaSki cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(6):2447-2451. doi:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.6.2447.
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W. 2013. Macrophage biology In development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446):445-455. doi:10.1038/nature12034.
- Xu, S., Huangfu, M., Jia, X., Song, X., Sun, B., Lee, K.H., Liu, L., Sun, S. 2015. FOXP3 autoantibody as a potential early prognostic serum biomarker in patients with cervical cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 20:982-988. doi:10.1007/s10147-015-0797-4.
- Yaddanapudi, L., Mitchell, R.A., Eaton, J.W. 2013. Cancer vaccines looking to the future. *OncoImmunology*, 2(3):e23403. doi.org/10.4161/onci.23403.

- Yamada, T., Wheeler, C., Halpern, A., Stewart, A., Hildesheim, A., Jenison, S. 1995. Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages in United States Populations Characterized by Nucleotide Sequence Analysis of the E6, E7, and L1 Coding Segments. *Journal of Virology*, 69(12):7743-7753.
- Yao, Y., Huang, W., Yang, X., Sun, W., Liu, X., Cun, W., Ma, Y. HPV-16 E6 and E7 protein T cell epitopes prediction analysis based on distributions of HLA-A loci across populations: An in silico approach. *Vaccine*, 31(18):2289-2294. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.065.
- Yoon, S.R., Kim, T.D., Choi, I. 2015. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. *Experimental and Molecular Medicine*, 47:1-11. doi:10.1038/emm.2014.114.
- Yuan, H., Fu, F., Zhuo, J., Wang, W., Nishitani, J., An, D.S., Chen, I.S.Y., Liu, X. 2005. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene*, 24:5069-5078. doi:10.1038/sj.onc.1208691.
- Yu, G., Bing, Y., Zhu, S., Li, W., Xia, L., Li, Y., Liu, Z. 2015. Activation of the interleukin-34 inflammatory pathway in response to influenza A virus infection. *American Journal of the Medical Sciences*, 349(2): 145-150. doi:10.1097/MAJ.0000000000000373.
- Yu, X., Gen, M. 2010. Introduction to Evolutionary Algorithms. *Decision Engineering*, Springer-Verlag London Limited 2010, Volume 0, Part II, 165-191, doi:10.1007/978-1-84996-129-5_5.
- Yu, X., Zhou, B., Zhang, Z., Gao, Q., Wang, Y., Song, Y., Pu, Y., Chen, Y., Duan, R., Zhang, L., Xi, M. 2015. Significant association between IL-32 gen polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer in Chinese han women. *Tumor Biology*, 36: 5265-5272. doi:10.1007/s13277-015-3186-8.
- Yuzhalin, A., Kutikhin, A. 2014. Interleukins in Cancer Biology: Their Heterogeneous Role- Chapter 1-10., edited by Arseniy E. Yuzhalin Anton G. Kutikhin, Academic Press, Amsterdam, 2015, Pages ix-x, ISBN 9780128011218, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801121-8.05001-6>.
- Zamarin, D., Postow, M.A. 2015. Immune checkpoint modulation: rationale design of combination strategies. 2015. *Pharmacology & Therapeutics*, 150:23-32. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.01.003.
- Zeeshan, M., Javed, H., Haider, A., Khan, A. 2015. An immunology inspired flow control attack detection using negative selection with r-contiguous bit matching for wireless sensor networks. *International Journal of Distributed Sensor Networks*, Article ID 169654, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/169654>.
- Zeng, J. 2015. Computer malicious executables detection based on real-valued negative selection algorithm. *Applied Mathematics and Information Sciences*, 2:1089-1094. doi.org/10.12785/amis/090260.
- Zhang, N., Hartig, H., Dzhalalov, I., Draper, D., He, Y.W. 2005. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Research*, 15(10):749-769.
- Zhang, Y., Wallace, D.L., de Lara, C.M., Ghattas, H., Asquith, B., Worth, A., Griffin, G.E., Taylor, G.P., Tough, D.F., Beverly, P.C.L., Macallan, D.C. 2007. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*, 121(2):258-265. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02573.x.
- Zhou, F., Leggatt, G.R., Frazer, H. 2011. Human papillomavirus 16 E7 protein inhibits interferon- γ -mediated enhancement of keratinocytes antigen processing and T-cell lysis. *Federation of European Biochemical Societies*, 278:955-963. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08011.x.
- Zhou, Q., Zhu, K., Cheng, H. 2013. Toll-like receptors in human papillomavirus infection. *Archivum immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(3):203-215. doi:10.1007/s00005-013-0220-7.
- Zhou, C.M., Zhang, G.X., Ma, X.X. 2014. Characterization and evaluation of the immune responses elicited by a novel human papillomavirus (HPV) therapeutic vaccine: HPV 16E7-HBcAg-Hsp65 fusion protein. *Journal of Virological Methods*, 197:1-6. doi:10.1016/j.jviromet.2013.10.033.
- Zhu, J., Mohan, C. 2010. Toll-Like Receptor Signaling Pathways-Therapeutic Opportunities, *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, Article ID 781235, 7 pages, 2010. doi:10.1155/2010/781235.
- Zhu, J. 2015. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine*, 75(1):14-24. doi:10.1016/j.cyto.2015.05.010.